

Utjecaj mitohondrijskog energijskog metabolizma i visoke koncentracije glukoze na ekspresiju gena pluripotencije SOX2 i NANOG i vijabilnost mezotelijskih stanica in vitro

Sikirić, Sunčana

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:709833>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Sunčana Sikirić

**Utjecaj mitohondrijskog energijskog
metabolizma i visoke koncentracije
glukoze na ekspresiju gena
pluripotentnosti *SOX2* i *NANOG* i
vijabilnost mezoteliomskih stanica *in
vitro***

DISERTACIJA



Zagreb, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Sunčana Sikirić

**Utjecaj mitohondrijskog energijskog
metabolizma i visoke koncentracije
glukoze na ekspresiju gena
pluripotentnosti *SOX2* i *NANOG* i
vijabilnost mezoteliomskih stanica *in
vitro***

DISERTACIJA

Zagreb, 2023.

Disertacija je izrađena na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sven Seiwert, dr. med.

Zahvaljujem se svojim kolegama i kolegicama čiji su savjeti i komentari unaprijedili ovu disertaciju.

Za svu potporu i vječni optimizam, posebno hvala mojem mentoru.

Zahvaljujem se i svojoj obitelji i prijateljima na svom strpljenju i ljubavi. Njima i posvećujem ovaj rad.

Sadržaj

1. UVOD I SVRHA RADA	1
1.1. Mezoteliom	1
1.2. Maligni pleuralni mezoteliomi	2
1.2.1. Širenje i metastaziranje	3
1.2.2. Liječenje i prognoza	4
1.3. Azbest	5
1.4. Geni pluripotencije	7
1.5. Metabolizam glukoze	8
1.6. Mitohondriji	9
1.6.1. Mitohondrijski energijski metabolizam	11
1.6.2. Modifikatori mitohondrijskog energijskog metabolizma	14
1.6.3. Mitohondrijski antioksidans	19
1.7. Antineoplastični agensi	20
1.8. Kultura stanica	21
2. HIPOTEZA	24
3. CILJEVI RADA	25
4. MATERIJALI I METODE	26
4.1. Modifikatori mitohondrijskog energijskog metabolizma i mitohondrijski antioksidans	26
4.2. Stanična linija Mero-14	27
4.3. Imunocitokemija	29
4.4. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom	31
4.5. Statistička analiza	33
5. REZULTATI	34
5.1. Visoka koncentracija glukoze i DCA mijenjaju proliferaciju stanica mezotelioma	34

5.2. Modifikatori mitohondrijskog energijskog metabolizma mijenjaju ekspresiju NANOG proteina	40
5.3. Modifikatori mitohondrijskog energijskog metabolizma mijenjaju ekspresiju SOX2 proteina	43
5.4. Učinak modifikatora mitohondrijskog energijskog metabolizma na citotoksičnost cisplatine i pemetrekseda	46
6. RASPRAVA	56
7. ZAKLJUČAK	67
8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU	69
9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU	70
10. LITERATURA	71
11. BIOGRAFIJA	87

Popis oznaka i kratica:

AKT	serin-treoninska kinaza (engl. <i>Ak strain transforming</i>)
AMPK	protein kinaza aktivirana adenzin monofosfatom (engl. <i>AMP-activated protein kinase</i>)
ANOVA	test analize varijance (engl. <i>analysis of variance</i>)
ATP	adenozin trifosfat (engl. <i>adenosine triphosphate</i>)
Bax	apoptotički aktivator povezan s Bcl-2 (engl. <i>Bcl-2 associated X protein</i>)
Bcl-2	proteini iz obitelji B-staničnog limfoma-2 (engl. <i>B-cell lymphoma-2</i>)
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CK5/6	citokeratin 5/6
CSC	matične stanice raka (engl. <i>cancer stem cells</i>)
D2-40	monoklonsko antitijelo usmjereno protiv M2a antigena
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DCA	dikloroacetat (engl. <i>dichloroacetate</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNP	2,4- dinitrofenol
FAD	flavin adenin dinukleotid
FADH	reducirani oblik flavin adenin dinukleotida
GPx	glutation peroksidaza (engl. <i>glutathione peroxidase</i>)
GSH	glutation (engl. <i>glutathione</i>)
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HIF	čimbenik induciran hipoksijom (engl. <i>hypoxia-inducible factor</i>)
HRP	peroksidaza hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)

IARC	Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
JAK	Janus kinaza
MAPK	MAP-kinaza; kinaza koja se aktivira mitogenima (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MPC	mitohondrijski nosač piruvata (engl. <i>mitochondrial pyruvate carrier</i>)
MPM	maligni pleuralni mezoteliom
MYC	produkt protoonkogena (engl. <i>MYC proto-oncogene</i>)
mTOR	meta rapamicina kod sisavaca (engl. <i>mammalian target of rapamycin</i>)
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NADH	reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotida
NANOG	nanog "homeobox" regija (engl. <i>Nanog homeobox</i>)
O ₂ ⁻	superoksidni anion
OCT4	oktamer vezujući transkripcijski faktor (engl. <i>octamer-binding transcription factor 4</i>)
OH·	hidroksilni radikal
p53	tumorski supresor, produkt gena <i>TP53</i>
PDH	piruvat dehidrogenaza
PDK	piruvat dehidrogenaza kinaza
PI3K/AKT	signalni put koji čine fosfoinozimid 3-kinaza i serin-treonin kinaza (engl. <i>phosphatidylinositol 3-kinase, serine-threonine kinase</i>)
PMF	protonska pokretačka sila (engl. <i>proton motive force</i>)
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
SOD	superoksid dismutaza

SOX2	spolno određujuća regija Y- box2 (engl. <i>sex determining region Y-box 2</i>)
STAT	signalni adapterski proteini (engl. <i>signal transducer and activator of transcription</i>)
TNM	sustav klasifikacije opsega proširenosti tumora, prisutnosti tumora u limfnim čvorovima i prisutnosti metastaza (engl. <i>tumor (T), nodes (N), metastases (M)</i>)
VEGFA	čimbenik rasta vaskularnog endotela A (engl. <i>vascular endothelial growth factor A</i>)
WT-1	produkt Wilms tumor supresor gena (engl. <i>Wilms tumor 1</i>)

1. Uvod i svrha rada

Svrha ovog istraživanja je, koristeći mezoteliomsku staničnu liniju Mero-14, ispitati kako visoka koncentracija glukoze i inhibitori te aktivator mitohondrijskog energijskog metabolizma utječu na ekspresiju gena i proteina pluripotentnosti SOX2 i NANOG te mogu li takvi tretmani mijenjati otpornost stanica na antineoplastične lijekove. Inhibitori i aktivatori mitohondrijskog metabolizma zajedno su u daljnjem tekstu označeni kao modifikatori mitohondrijskog metabolizma.

Dobiveni rezultati pružit će nove spoznaje o ulozi mitohondrijskog metabolizma i visoke koncentracije glukoze u modificiranju vijabilnosti stanica mezotelioma. Naši rezultati mogli bi otvoriti put novim istraživanjima u kojima bi se testiralo može li se farmakološka modifikacija mitohondrijskog metabolizma i/ili visoka koncentracija glukoze koristiti za poboljšanje liječenja mezotelioma.

1.1. Mezoteliom

Mezoteliom je agresivan zloćudni tumor mezotelnih stanica koji se obično pojavljuje u mezotelialnim površinama tkiva pleure, ali se također može pojaviti i u peritoneumu, perikardu te u ovojnici *tunica vaginalis testis*. Ova se vrsta tumora češće javlja kod muškaraca i to u petom i šestom desetljeću života. Povećana učestalost mezotelioma zabilježena je kod osoba izloženih azbestu i to obično nakon perioda latencije od 25 do 45 godina (1). Otprilike 90 % malignih mezotelioma javlja se u pleuri, a većina preostalih slučajeva javlja se u peritoneumu.

Simptomi zbog kojih se pacijenti javljaju često uključuju: promuklost, otežano disanje, trajni kašalj i bolove u prsima ili leđima. Često bolest bude otkrivena tek u uznapredovalom stadiju, a petogodišnja relativna stopa preživljavanja iznosi 10 % (prema podacima za Sjedinjene Američke Države) (1).

Općenito, postoji manjak podataka o incidenciji i smrtnosti mezotelioma za veliki dio svjetske populacije, pogotovo za zemlje koje još koriste azbest u istočnoj Europi, Aziji, Južnoj Americi te većini Afrike (2).

Dugoročan učinak ionizirajućeg zračenja također može biti povezan s razvojem mezotelioma, iako u daleko manjoj mjeri nego azbest (3). Rizik od razvoja ove bolesti značajno je veći u slučajevima ranijeg izlaganja agensima koji emitiraju α -čestice, kao što je radioaktivni kontrast Thorotrast. Također, mezoteliom se često pojavljuje u pacijenata koju su preživjeli rak testisa i Hodgkinov limfom, ako je bila primjenjivana radioterapija (3).

1.2. Maligni pleuralni mezoteliomi

Pleura je tanka i elastična membrana koja pokriva cijelu unutarnju površinu torakalne šupljine. Parijetalna pleura pokriva torakalni zid, medijastinum, srce i dijafragmu, a visceralna pleura pokriva pluća (2).

Maligni pleuralni mezoteliom (MPM) makroskopski se najčešće očituje kao nakupina sivih ili bijelih, slabo ograničenih čvorova koji infiltriraju difuzno zadebljanu pleuru uz prisutnost pleuralnog izljeva. Mikroskopski, tumor čine kubične stanice obilne citoplazme koje tvore resice, pseudoacinuse ili solidna gnijezda. Također, u određenoj su mjeri prisutna i obilježja zloćudnosti kao što su: prožimanje dubokih tkiva (pluća u slučaju visceralne pleure, a masnog tkiva i mišića u slučaju parijetalne pleure), citološka atipija, izrazito grupiranje stanica i nekroza (4,5).

MPM se histološki dijeli na 3 tipa: epiteloidni, sarkomatoidni i bifazni.

Epiteloidni MPM je građen od stanica koje podsjećaju na epitelne, a danas razlikujemo brojne podtipove (4).

Sarkomatoidni MPM je izrazito celularan tumor građen od isprepletenih snopova vretenastih stanica, a ponekad i od stanica sličnih stanicama fibroblastoma. U rijetkim slučajevima može sadržavati žarišta koštane i hrskavične metaplazije. Česta je prisutnost atipije jezgara i mitozna. Imunohistokemijski, ovaj tip pokazuje pozitivnost na keratin, vimentin i aktin. Sarkomatoidni MPM ima nekoliko podtipova: dezmoplastični, limfohistiocitoidni i deciduoidni. Dezmoplastični podtip je karakteriziran obilnijim odlaganjem vezivnog tkiva. Limfohistiocitoidni podtip je vrlo agresivan tumor karakteriziran difuznom proliferacijom atipičnih mezotelnih stanica nalik histiocitima pomiješanih s infiltratom limfocita i plazma stanica. Posljednji, deciduoidni podtip je građen od krupnih stanica s obilnom citoplazmom nalik na brušeno staklo, što podsjeća na decidualne stanice (4). Bifazični (mješoviti) MPM građen je od sarkomatoidnih i od epiteloidnih dijelova (5).

1.2.1. Širenje i metastaziranje

Mezoteliom se širi lokalno mehanizmima doticanja i usađivanja kroz cijeli pleuralni prostor, oba lista pleure, pregrade među režnjcima pluća, perikard, stijenku prsišta, ošit i peritoneum. Tkivo pluća postupno prožima od površine prema dubljim segmentima. Udaljene metastaze pojavljuju se u kasnijim stadijima bolesti (4).

1.2.2. Liječenje i prognoza

Kirurško liječenje MPM-a, iako često bez velikih uspjeha, podrazumijeva pneumonektomiju, parijetalnu i medijastinalnu pleurektomiju ili dijafragmektomiju. Ponekad u kombinaciji s radioterapijom ili antineoplastičnim agensima (cisplatina, pemetreksed) može dovesti do dugotrajnih remisija (4,5).

Na prognozu utječu čimbenici kao što su stadij, gdje je lošija prognoza povezana s višim stadijem, zatim spol, gdje je prognoza lošija kod muškaraca te histološki tip tumora, gdje je najlošija prognoza kod sarkomatoidnog tipa, a bolja kod dobro diferenciranih tumora (4).

Glavni kriterij za dijagnozu mezotelioma je prisutnost invazije u tkivo pluća i/ili torakalnu stijenu, a dijagnoza se može postaviti i kad se radi o solidnoj tumorskoj masi građenoj od malignih mezotelinih stanica. Za potvrdu da se radilo o mezotelinim stanicama koriste se markeri: kalretinin, CK5/6, WT-1 ili D2-40, a kao pokazatelj malignosti uzima se gubitak BAP-1 pozitiviteta koji se dokazuje imunohistokemijski (5).

Smatra se da udahnuta azbestna vlakna ili druga kancerogena vlakna završe u pleuri i tamo induciraju citotoksičnost, oštećuju deoksiribonukleinsku kiselinu (engl. *deoxyribonucleic acid, DNA*), aktiviraju fagocite i dovode do kronične upale (6,7). Azbestna vlakna uzrokuju oštećenja kromosoma te dovode do mutacija, a također su i citotoksična *in vitro* te induciraju abnormalnu segregaciju stanica u mitozu (8).

Citogenetičke studije su pokazale da mezoteliomi imaju visoko kompleksne i varijabilne kromosomske aberacije i da je tek nekoliko njih zajedničko svim pacijentima. Analize gubitka heterozigotnosti su pokazale učestale delecije specifičnih mjesta na kromosomima: 1p, 3p, 6q, 9p, 13q, 15q i 22q. Najčešće su promijenjeni tumor supresorski geni *CDKN2A-ARF* u regiji 9p21 i *NF2* u regiji 22q12 (9). Do

značajnih mutacija dolazi i u genima: *BAP1*, *TP53*, *DDX3X*, *SETD2*, *SF3B1* i *TRAF7* (10). S obzirom na to da se mezoteliom razvije u manjini ljudi izloženih azbestu uz povećanu pojavnost u nekim obiteljima, pretpostavlja se da je osim primarnog i sekundarnog izlaganja azbestu potrebna i genetska podloga koja pogoduje razvoju ove bolesti. Gen *BAP1* nalazi se u kromosomskoj regiji 3p21, a gubitak njegove funkcije je detektiran u 30 – 60 % mezotelioma. Protein BAP1 ima mnogo funkcija, uključujući transkripcijsku regulaciju, kromatinsku regulaciju i formiranje multiproteinskih kompleksa koji reguliraju staničnu diferencijaciju, glukoneogenezu, transkripciju i apoptozu (11,12). Istraživanja su pokazala da nasljedne mutacije u *BAP1* genu dovode do poremećaja koji povećavaju rizik za razvoj različitih vrsta malignih i benignih tumora i to najčešće na koži, očima, bubrezima i mezotelu. Mezoteliomi koji nastaju zbog ovog poremećaja obično se razvijaju na peritoneumu i rjeđe na pleuri (13).

1.3. Azbest

Azbest je pojam koji opisuje skupinu vlaknastih, silikatnih minerala koji se prirodno pojavljuju u stijenama i tlu. U azbest se ubrajaju minerali iz skupina serpentina i amfibola. To uključuje mineral krizolit (poznat i kao „bijeli azbest“), aktinolit, amozit (poznat i kao „smeđi azbest“), antofilit, krokidolit (poznat i kao „plavi azbest“) i tremolit (14).

Iako azbest nije hlapljiv, azbestna vlakna mogu dospjeti u atmosferu prirodnim i antropogenim putem. Utjecaj atmosferilija na stijene koje nose azbestne minerale primarni je način dospijevanja njihovih dijelova u atmosferu. Antropogene aktivnosti kao što su iskopavanja i obrada ruda te korištenje, uništavanje i odlaganje proizvoda koji sadržavaju azbest, glavni su način njegovog dospijevanja u atmosferu (15).

Zbog iznimnih fizikalnih svojstava kao što su niska toplinska i električna vodljivost, ljudi koriste azbest već tisućama godina. Još je Plinije Stariji pisao da su se ovi minerali iskopavali i da se azbest mogao presti i tkati u materijal koji je otporan na vatru (16), a Marko Polo je opisao eksploataciju azbesta u Kini (17).

Prvi slučaj pleuralnog tumora zabilježio je 1767. godine Joseph Lieutand, a prvi primjer mezotelioma opisali su Klemperer i Rabin 1931. godine (18). Tek 30 godina kasnije, mezoteliom je prihvaćen kao zaseban tumorski entitet, a prva epidemiološka studija koja ga je povezala s azbestom objavljena je 1960. godine. Tom je studijom pokazano da je mezoteliom učestala bolest kod ljudi koji žive i rade u krugu rudnika azbesta (krokidolita), a kasnije su i druge studije potvrdile povezanost inhalacije azbestnih čestica i razvoja mezotelioma (19–22).

Godine 2006. Svjetska zdravstvena organizacija procijenila je da je godišnje globalno 125 milijuna ljudi profesionalno izloženo azbestu. Inhalacija i gutanje primarni su načini izlaganja azbestu, dok je apsorpcija preko kože zanemariva. Ipak, ostaci vlakana koje ljudi mogu nositi na koži, odjeći i kosi mogu dovesti do naknadnog inhaliranja ili gutanja azbestnih vlakana, odnosno sekundarnog izlaganja (23).

Azbestna vlakna variraju veličinom, promjerom i kemijskim sastavom što utječe na njihovo kretanje, deponiranje ili uklanjanje iz organizma, a time i na njihov kancerogeni potencijal. Stupanj penetracije vlakana u pluća ovisi o promjeru vlakna, pri čemu tanja vlakna imaju veći potencijal za deponiranje u distalnim dijelovima dišnih puteva (24).

Danas su, prema mišljenju Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer, IARC*), sva azbestna vlakna klasificirana kao kancerogeni za ljude i odgovorna su za razvoj mezotelioma i raka

grkljana, pluća i jajnika, a uočena je i snažna povezanost između izlaganja azbestu i razvoja raka ždrijela i želuca (25).

1.4. Geni pluripotencije

Matične stanice raka (engl. *cancer stem cells*, *CSC*) mala su podskupina stanica raka sa svojstvima samoobnavljanja koje pridonose razvoju tumora, infiltraciji okolnih tkiva, metastaziranju i recidiviranju bolesti te ostaju u organizmu i nakon liječenja konvencionalnim terapijama (26,27). Glavni transkripcijski faktori koji su izraženi kod CSC-a su: oktamer vezujući transkripcijski faktor (OCT4), spolno određujuća regija – “box2” (SOX2) i nanog “homeobox” regija (NANOG) (26,28). Ovi faktori održavaju pluripotentnu narav stanice jer je njihova interakcija ključna za transkripcijsku regulaciju i supresiju ekspresije gena koji vode k diferencijaciji (29). Njihova konstitutivna ekspresija dovodi do inhibicije diferencijacije (30). Ovi su transkripcijski faktori prepoznati i kao prediktivni biomarkeri za lošu prognozu u više vrsta karcinoma uključujući: hepatocelularni karcinom, ezofagealni karcinom pločastih stanica i karcinom jajnika (26).

OCT4 jedan je od faktora koji igraju ključnu ulogu u održavanju samoobnavljanja, pluripotencije i diferencijacije. Pronađena je pozitivna korelacija između povišene ekspresije OCT4, slabije diferencijacije i višeg stadija bolesti po TNM klasifikaciji (engl. *tumor, nodes, metastases*, *TNM*) kod oboljelih od nesitnostaničnog karcinoma pluća (31). Također, OCT4 ima sposobnost povećati broj CSC-a što dovodi do rezistencije na radioterapiju, kemoterapiju i druge konvencionalne sistemske terapije te tako smanjuje terapijski učinak. OCT4 regulira i više signalnih puteva, uključujući p38 mitogen-aktiviranu protein kinazu (MAPK), serin-treoninsku kinazu (AKT) i Janus kinazu (JAK) - signalni adapterski proteini 3 (engl. *signal transducer and*

activator of transcription, STAT), čime dovodi do promocije tumorogeneze i maligne transformacije, uz povećanje vjerojatnosti za povrat bolesti (26).

SOX2 i NANOG su odgovorni za mnoge procese tijekom tumorogeneze u različitim tumorima kao što su karcinom pluća, dojke i endometrija. Pokazana je pozitivna povezanost SOX2 proteina s pojavom metastaza u limfnim čvorovima, lošim preživljenjem neovisnim o proširenosti bolesti i preživljenjem pacijenata sa sitnostaničnim karcinomom pluća nakon prve kemoterapije (31).

1.5. Metabolizam glukoze

Svaka živa stanica mora proizvoditi i transformirati energiju kako bi se mogli stvarati i održavati gradijenti na staničnoj membrani, odvijati transkripcija i translacija, popravci DNA te mnoge druge vitalne aktivnosti. Osim procesa koji osiguravaju homeostazu, proliferirajuće stanice moraju zadovoljiti i potrebe za energijom koja se ulaže u rast i diobu. To znači da proliferirajuće stanice trebaju priskrbiti velike količine nutrijenata te ih pretvoriti u osnovne građevne jedinice potrebne za stvaranje makromolekula esencijalnih za formiranje nove stanice (32,33).

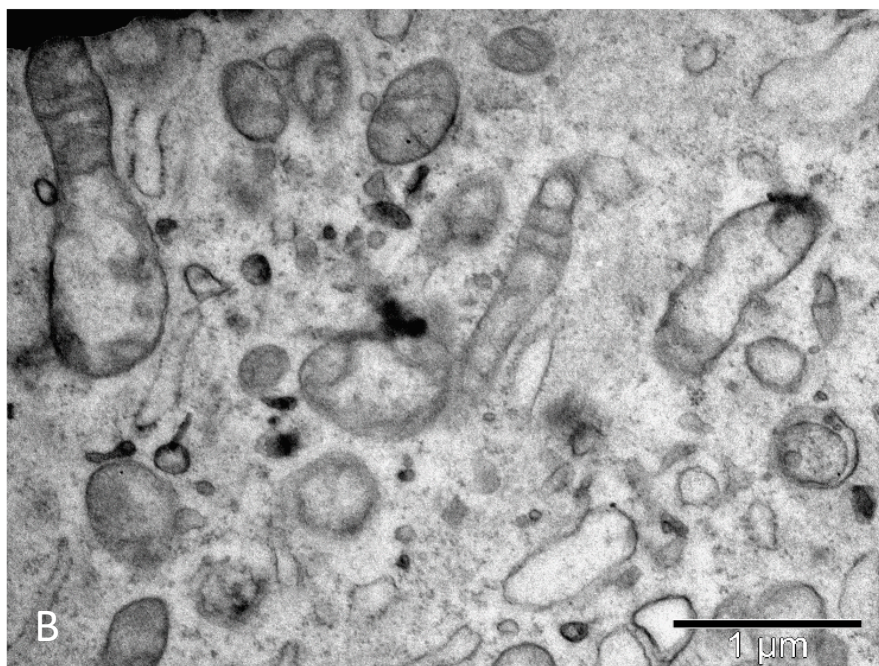
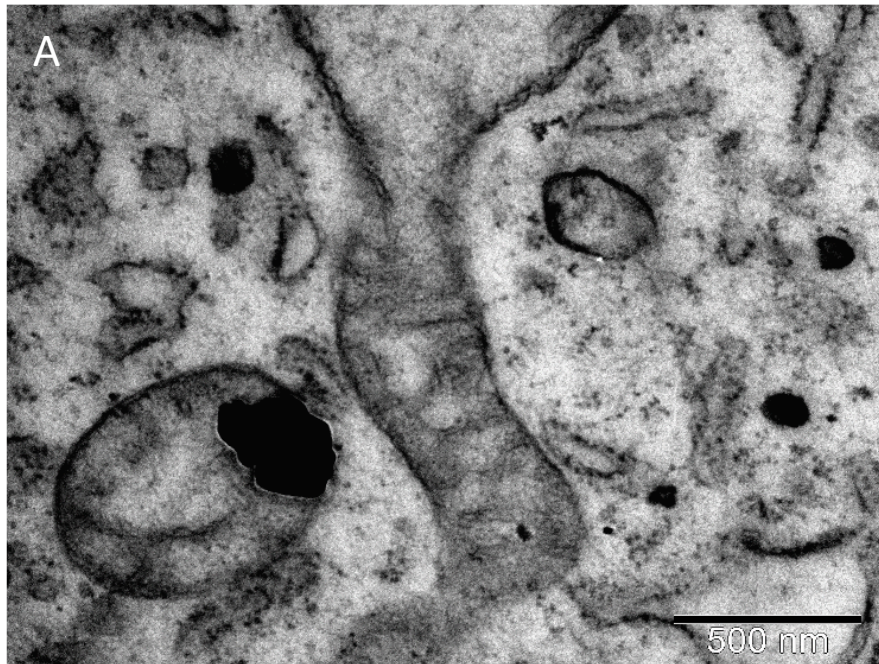
Glavni izvor ugljika potrebnog za biosintezu i proizvodnju energije je glukoza. Glukoza se metabolizira putem glikolize do piruvata koji onda u aerobnim uvjetima može dalje sudjelovati u Krebsovom ciklusu ili se, u hipoksičnim uvjetima, pretvara u laktat. U aerobnim i anaerobnim uvjetima, glikoliza proizvodi ATP. Iako glikoliza proizvodi daleko manje molekula ATP-a od oksidativne fosforilacije, u anaerobnim uvjetima, ona je ključni izvor ATP-a za preživljenje stanice (33).

1.6. Mitochondriji

Mitochondriji su stanični organeli koji imaju vlastitu DNA, dijele se i rastu djelomično neovisno o stanici (Slika 1). Neophodni su za život budući da stvaraju ATP iz hrane, ali imaju i druge funkcije, kao što je skladištenje kalcija, proizvodnja ROS-a, biosinteza i pokretanje apoptoze (34). Oni su jedini stanični organeli s lužnatim pH okolišem zbog jedinstvenih protonskih pumpi koje generiraju protonski elektrokemijski gradijent što pokreće proizvodnju ATP-a (35). U zdravoj stanici je populacija mitohondrija uglavnom homogena. U dobrom zdravlju, proizvodnja ROS-a je niska, proizvodnja ATP-a visoka, razine kalcija su niske u citosolu, a skladištenje kalcija u mitohondrijima je visoko. U slučaju disfunkcije mitohondrija, proizvodnja ATP-a može pasti, a proizvodnja ROS-a porasti (36).

Kada se molekule ROS-a formiraju, kao nusprodukt u zdravoj stanici, stanični antioksidansi, enzimatski i neenzimatski ih eliminiraju. Kada dođe do prekomjerne proizvodnje ROS-a, ove molekule reagiraju s većinom staničnih molekula, uključujući DNA, proteine i lipide, što najčešće dovodi do njihove disfunkcije. U interakciji s lipidima ROS može formirati izoprostane. Izoprostani su molekule slične prostaglandinu koje nastaju neovisno o ciklooksigenazi peroksidacijom arahidonske kiseline izazvane slobodnim radikalima (37).

Dakle, ispravno funkcioniranje mitohondrija je bitno za mnoge stanične funkcije kao što je proizvodnja energije i stanična signalizacija. S druge strane, disfunkcionalni mitohondriji mogu proizvoditi velike količine ROS-a i poticati apoptozu. Stoga su zdravi mitohondriji od iznimne važnosti za vitalnost stanice (36).



Slika 1. Mitochondriji u stanicama Mero-14 snimljeni elektronskim mikroskopom. A. Povećanje 60 000x. B. Povećanje 30 000x.

1.6.1. Mitohondrijski energijski metabolizam

U organizmu sisavaca postoje dva glavna metabolička puta koja pribavljaju energiju: laktatna fermentacija i aerobna respiracija. U fermentaciji, koja se odvija u citosolu, glukoza se pretvara u piruvat kroz glikolizu, a zatim se reducira do laktata koji se potom izlučuje u mikrokoliš stanice (krvotok). U ovom procesu razgradnje glukoze iz jedne molekule glukoze koja ulazi u reakciju stvaraju se dvije molekule ATP-a. Proces aerobne respiracije složen je proces u kojem se glukoza i drugi supstrati potpuno oksidiraju do ugljikovog dioksida i vode. On se sastoji od glikolize te Krebsovog ciklusa i oksidativne fosforilacije, procesa koji se odvijaju u mitohondriju. Aerobna respiracija proizvodi puno više energije od laktatne fermentacije, ali može se odvijati isključivo u prisutnosti kisika koji ima funkciju elektronskog akceptora (38).

Jednu od prvih studija koja se bavila energijskim metabolizmom tumora, još u dvadesetim godinama 20. stoljeća, vodio je Otto Warburg. On je promatrao uzorke živih tkiva te je primijetio specifične metaboličke promjene kod tumorskih stanica: u normalnom tkivu do proizvodnje laktata dolazi u anaerobnim uvjetima, dok se u tumorskom tkivu fermentacija odvija čak i kada su tkivu dostupne dovoljne količine kisika. Warburg je, stoga, zaključio da tumorske stanice mogu preusmjeriti svoj metabolizam s oksidativne fosforilacije na glikolizu i posljedično na stvaranje mliječne kiseline, čak i uz prisustvo kisika, što dovodi do stanja koje se naziva "aerobna fermentativna glikoliza" (u literaturi se često koristi skraćena verzija „aerobna glikoliza“ ili „Warburgov efekt“), a supresija aerobnog metabolizma u tumorskim stanicama pripisivala se disfunkciji mitohondrija i oksidativne fosforilacije (39).

Warburgova hipoteza bila je testirana i pokazana u više vrsta tumora. Carl i Gerty Cori svojim su pokusom dokazali povećan unos glukoze kod stanica raka te su

ustanovili da je doista došlo do preusmjerenja glikolitičkog metabolizma na anaerobnu fermentaciju (40).

Warburgovi su zaključci bili kritizirani već iste godine kada su i objavljeni, ali teorija o aerobnoj glikolizi zadržala se do danas, iako djelomično ispravljena budući da su razvoj i napredak mjernih metoda, koje mogu precizno pratiti tijek metaboličkih reakcija, pružile mnogo podataka o stopama respiracije i potencijalu mitohondrijskih membrana u mnogim staničnim linijama raka (41).

Danas znamo da se eliminacijom mitohondrijske DNA mogu ukloniti mitohondriji iz stanica raka što smanjuje brzinu rasta tumorskih stanica i njihovu tumorogenost (42). Mitohondriji koordiniraju veliki dio metaboličkih, energijskih i fizioloških procesa pa je stoga upravo promjena njihove funkcije često jedna od glavnih točaka maligne transformacije. Promjene na genetskoj razini u enzimima mitohondrijskog metabolizma, kao što su hidrataza, sukcinat dehidrogenaza, izocitrat dehidrogenaza, povećavaju sklonost nastanku raka ili pridonose njegovom razvoju (43,44). Također, prilikom transplantacije ρ^0 tumorskih stanica (tumorske stanice kojima nedostaje mitohondrijska DNA ili je utišan mitohondrijski transkripcijski faktor, zbog čega nemaju funkcionalne mitohondrije) u miševе, tumori su se manje učinkovito formirali nego kad su se transplantirale tumorske stanice koje su sadržavale mitohondrije (45). Dakle, iako je razina oksidativne fosforilacije kod tumorskih stanica smanjena, dokazano je da mitohondriji i dalje koriste kisik i stvaraju ATP te da su važni za funkciju tumorskih stanica. Stoga se može zaključiti da ne postoji jednoznačni prelazak s oksidativne fosforilacije na glikolizu već se ta dva procesa odvijaju paralelno. Glikoliza je pojačana zbog povećanih potreba za metaboličkim produktima koji nastaju kao intermedijarni spojevi, ali i zbog potrebe za energijom koja se troši u proliferacijskim procesima (46,47). Glavne karakteristike glikolize u tumorima su

povećan unos glukoze, sinteza glikogena, proizvodnja laktata i inducirana acidoza koja vodi u tumorsku invaziju. Aktivnost glikolitičkih enzima kao što su laktat dehidrogenaza, fosfofruktokinaza i heksokinaza II povisuje se u hipoksičnim uvjetima što je povezano s inhibicijom apoptoze i kemorezistencijom (48,49). Prekomjerna produkcija laktat dehidrogenaze A i B katalizira konverziju piruvata u laktat te se laktat izlučuje u mikrookoliš što pridonosi povećanju kiselosti (50). Lokalno zakiseljavanje okoliša olakšava invaziju stanica raka preko povišenog izražaja vaskularnog endotelnog faktora rasta A (VEGFA), a laktat također može stimulirati i proizvodnju hijaluronske kiseline koja se veže na CD44, stanični receptor koji regulira migracijske i invazijske procese povezane s metastaziranjem (51–53).

Posljedica metaboličkih alteracija jest i promjena brzine dijeljenja stanica. Naime, aerobna glikoliza je manje učinkovita kada je u pitanju količina proizvedenog ATP-a, ali traje kraće od klasične glikolize. U procesu nastanka laktata iz jedne molekule glukoze nastat će 2 molekule ATP-a dok će potpuna oksidacija glukoze, kroz oksidativnu fosforilaciju, proizvesti čak 36 molekula ATP-a. Unatoč malom broju molekula ATP-a proizvedenih u tom procesu, aerobna glikoliza traje daleko kraće od klasične glikolize pa se ATP proizvodi puno brže (32,54).

Pomak iz oksidativnog u glikolitički metabolizam uključuje aktivaciju fosfoinozimid 3-kinaza i serin-treonin kinaza (signalni put, engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*, *serine-threonine kinase*, *PI3K/AKT*) što je jedna od najčešćih promjena u stanicama raka općenito, pa ni MPM nije iznimka. Aktivacija ovog signalnog puta povećava ekspresiju transportera za glukozu i druge nutrijente na površini stanice te pojačava ekspresiju glikolitičkih i lipogenih gena, stimulira heksokinazu i fosfofruktokinazu da pokreću glikolizu, te aktivira mTOR (55,56). Iako glikoliza može

brzo stvoriti ATP u uvjetima s malo kisika, bitna je i za stvaranje redukcijskih ekvivalenata za staničnu biogenezu i antioksidativnu obranu (55).

Metaboličkim promjenama kod malignih stanica pridonose i signalni putevi koje kontroliraju p53, HIF, MYC te AMPK (57).

1.6.2. Modifikatori mitohondrijskog energijskog metabolizma

Dikloroacetat (engl. *dichloroacetate*, *DCA*) inhibira piruvat dehidrogenaza kinazu (PDK) (Slika 2). Fosforilacijom piruvat dehidrogenaze (PDH), PDK je inhibira i sprječava konverziju piruvata u acetil koenzim A. Stvaranje acetil koenzima je nužno za ulazak piruvata u Krebsov ciklus, odnosno oksidativnu fosforilaciju. Dakle, DCA disinhibira piruvat dehidrogenazu i pojačava ulazak piruvata u oksidativnu fosforilaciju, proces koji je inače smanjen u tumorima (58).

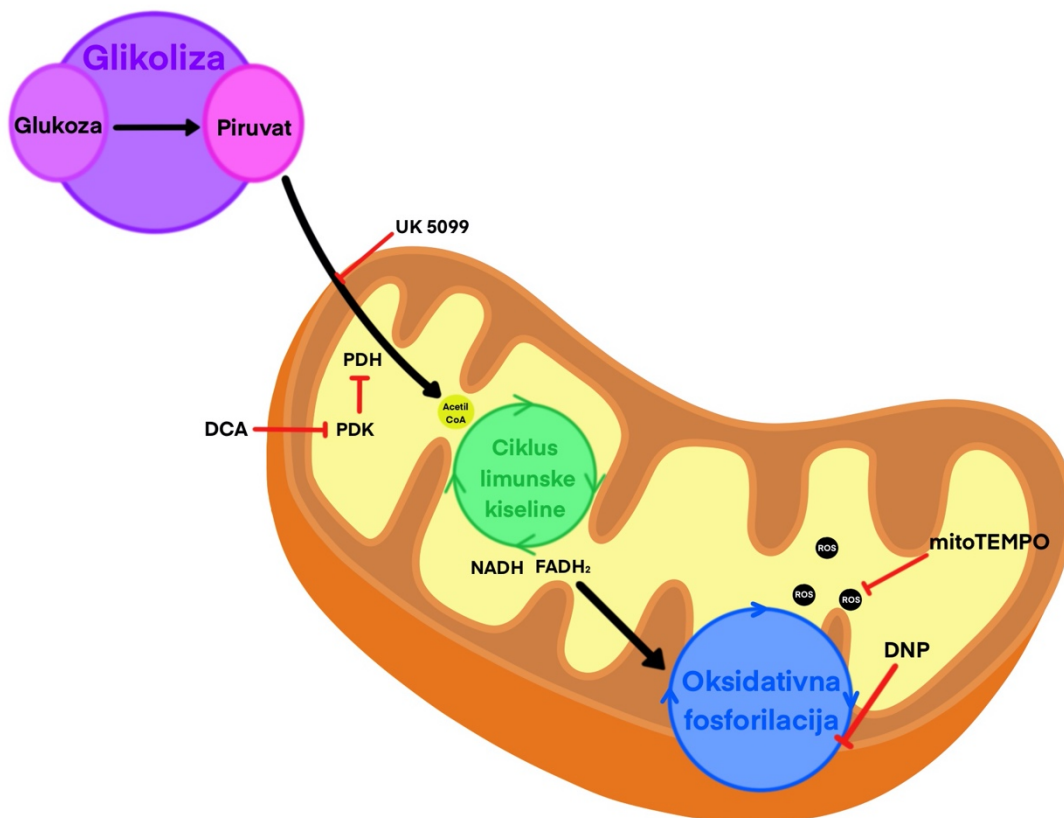
Piruvat ulazi u mitohondrije preko mitohondrijskog nosača piruvata (engl. *mitochondrial pyruvate carrier*, *MPC*), kompleksa sastavljenog od membranskih proteina MPC1 i MPC2 na unutarnjoj mitohondrijskoj membrani, koji prenosi piruvat do mitohondrijskog matriksa (59). Jednom kada je piruvat unutar mitohondrija, usmjerava se u proizvodnju ATP-a ili u biosintezu, uključujući sintezu nukleotida i aminokiselina, lipogenezu i glukoneogenezu. Iz toga proizlazi da povećanje ili smanjenje MPC aktivnosti odgovara pomacima prema oksidativnom, odnosno glikolitičkom metabolizmu (60).

Poznato je da UK 5099 (2-acijano-(1-fenilindol-3-il)-akrilat) specifičnom modifikacijom tiolne skupine inhibira MPC (Slika 2). Dokazano je i da su nakon primjene UK 5099, stopa potrošnje kisika, proizvodnja ATP-a i membranski potencijal

mitohondrija značajno smanjeni, dok su izvanstanični efluks laktatne kiseline i proizvodnja ROS-a značajno povećani u tumorskim stanicama (61,62).

Neki karcinomi pokazuju djelomični do potpuni gubitak ekspresije MPC-a koji je povezan s povećanom proliferacijom stanica i ekspresijom markera matičnih stanica. Kod LnCap stanične linije raka prostate nakon primjene UK 5099 zabilježene su više razine markera pluripotentnosti stanica OCT4 i NANOG-a. Ispitivanje kemorezistencije ustanovilo je da su stanice tretirane UK 5099 postale otpornije na kemoterapiju u usporedbi s netretiranim stanicama (62). Potrošnja glukoze, oslobađanje laktata i brzina izvanstaničnog zakiseljavanja povećani su u obje stanične linije SiHa (rak vrata maternice) i 4T1 (rak dojke) nakon izlaganja UK 5099 (10 μ M) (63). Suprotno tome, na karcinome koji se oslanjaju na korištenje mitohondrijalnog piruvata za održavanje rasta negativno utječe poremećaj MPC-a. Utvrđeno je da je inhibicija mitohondrijskog metabolizma, izazvana UK 5099, dovela do ublažavanja tumorske hipoksije i radiosenzibilizacije FaDu tumorskog modela (karcinom pločastih stanica ždrijela) (64).

Proces mitohondrijske oksidativne fosforilacije temelji se na kemiosmotskoj teoriji prema kojoj je oksidacija hranjivih tvari povezana s proizvodnjom ATP-a putem niza redoks reakcija u kompleksu transportnog lanca elektrona, što u konačnici rezultira redukcijom molekularnog kisika u vodu, u kompleksu IV. U nefotosintetskim stanicama, oksidativna fosforilacija ADP-a u ATP, na račun redukcije supstrata (NADH, FADH₂), odvija se u mitohondriju. Protonske pumpe koje su dio kompleksa respiratornog lanca sprežu prijenos elektrona s pumpanjem protona preko unutarnje membrane mitohondrija u međumembranski prostor, stvarajući protonski elektrokemijski gradijent. Nastali gradijent koristi ATP sintaza koja stvara ATP (65).



Slika 2. Modifikacije mitohondrijskog energijskog metabolizma u ovoj disertaciji.

Prijenos elektrona kroz komplekse I, III i IV osigurava energiju za pumpanje protona iz mitohondrijskog matriksa u međumembranski prostor kako bi se stvorio gradijent koncentracije protona ($\Delta p\text{H}$) i membranski potencijal ($\Delta\psi_m$) koji zajedno tvore protonsko-pokretačku silu (engl. *proton motive force*, *PMF*; Δp). Stvoreni elektrokemijski protonski gradijent PMF-a pokreće protone (H^+) iz međumembranskog prostora kroz kompleks V (ATP sintaza) u unutarnjoj mitohondrijskoj membrani u mitohondrijski matriks (66). Protok protona kroz ATP sintazu oslobađa energiju koja se koristi za sintezu ATP-a. Međutim, protoni mogu ponovno ući u mitohondrijski matriks neovisno o ATP sintazi putem procesa koji je odvojen od proizvodnje ATP-a (67,68). Naime, intermedijarni proteini i lipidi, uključujući proteine za rasprezanje (engl. *uncoupling proteins*) i masne kiseline mogu vraćati protone u mitohondrijski matriks

neovisno o ATP sintazi (69). Osim endogenih mehanizama mitohondrijskog raspredanja, farmakološko raspredanje mitohondrija (unos protona mimo ATP sintaze) može biti posredovano malim molekulama poput spoja 2,4-dinitrofenola (DNP) koje se deprotonira kada uđe u alkalni pH mitohondrijskog matriksa (70).

DNP je slaba kiselina topiva u lipidima koja djeluje kao nosač protona jer može prijeći membranu, odvojiti se od protona, vratiti se kao anion preko membrane, a zatim se ponovo reprotonirati ponavljajući ciklus. Na taj način smanjuje elektrokemijski gradijent na mitohondrijskoj membrani i raspredže oksidativnu fosforilaciju (Slika 2) (71).

DNP je jedan od najranijih poznatih protonofornih mitohondrijalnih agensa raspredanja. Prvi put je korišten u SAD-u 1933. godine kao sredstvo za smanjenje tjelesne mase. Međutim, Američka agencija za hranu i lijekove ga je uklonila s tržišta 1938. godine zbog značajnih štetnih učinaka i smrti izazvane teškom hipertermijom, hiperlaktacidemijom, hepatotoksičnošću i srčanim arestom, uz što se javljala i katarakta i agranulocitoza (69,72). Ti su smrtni slučajevi pogoršani nemarnim samoliječenjem, brzom oralnom i dermalnom apsorpcijom te činjenicom da su pacijenti različito reagirali već i na najmanje varijacije u dozi.

Studije su pokazale da DNP, ovisno o dozi, može inducirati apoptozu u različitim ljudskim staničnim linijama raka. U Jurkat stanicama koje su u osnovi besmrtni T limfociti i CEM limfoblastičnoj staničnoj liniji, primjena DNP-a pojačala je sposobnost stanice da inducira apoptozu preko receptora CD95 (73,74). U Calu-6 staničnoj liniji karcinoma pluća DNP je pri dozi od 1 mM uzrokovao zaustavljanje staničnog ciklusa u G1 fazi (75). Pokazano je i da je mehanizam citotoksičnosti DNP-a povezan s povećanom ekspresijom inhibitora kinaza ovisnih o ciklinu p27, povišenim omjerom Bax i Bcl-2 proteina, aktivacijom kaspaze-3 i -9, poremećajem $\Delta\Psi_m$, smanjenjem

razine glutationa (engl. *glutathione*, GSH) i povećanjem unutar stanične proizvodnja ROS-a (75,76). Znakovito je, međutim, da je DNP također inducirao citotoksičnost u limfocitima periferne krvi, što sugerira da nema selektivnu toksičnost prema stanicama raka već da uzrokuje smrt i zdravih stanica (75).

DCA se već koristi za liječenje akutne i kronične laktacidoze, urođenih grešaka mitohondrijskog metabolizma i dijabetesa (77). DCA je analog octene kiseline u kojoj su dva od tri atoma vodika metilne skupine zamijenjena atomima klora (78). Soli DCA molekule usmjeravaju metabolizam stanica raka s glikolize na oksidativnu fosforilaciju inhibicijom PDK-a, inhibitora PDH (58). Aktivacija PDH potiče mitohondrijsku oksidaciju piruvata i mijenja metabolizam stanica raka. Također, smanjujući proizvodnju laktata, DCA smanjuje acidozu u tumoru, pridonoseći inhibiciji rasta i širenja tumora (79). Primjena DCA u dozama u rasponu od 50 do 200 mg/kg povezana je sa smanjenjem volumena tumorske mase, brzine proliferacije i diseminacije metastaza u nekoliko prekliničkih modela (58). Primjena DCA na HSC-2 i HSC-3 stanične linije planocelularnog karcinoma usne šupljine rezultirala je stimulacijom respiratorne aktivnosti i izazvala izrazito jak pro-apoptotički i citostatski učinak koji je bio popraćen opsežnim remodeliranjem mitohondrijske mreže, što je dovelo do fragmentacije organela i povećane produkcije ROS-a (80). U staničnim linijama raka gušterače PANC-1 i BXPC-3, DCA je djelovao na smanjenje stanične proliferacije i migracije, ali nije značajno pojačao apoptozu što ukazuje na citostatski, a ne na citotoksični učinak (81). Ovi rezultati pokazuju da učinkovitost DCA u inhibiciji rasta raka ovisi o fenotipu stanice i višestrukim metaboličkim putevima.

1.6.3. Mitohondrijski antioksidans

Mitohondriji su najčešće glavni stanični izvor stvaranja ROS-a koji nastaje kao posljedica bijega elektrona iz respiratornog lanca tijekom oksidativne fosforilacije (82). Elektroni koji izlaze iz respiratornog lanca mogu reagirati s kisikom i proizvesti superoksidni anion (O_2^-). Superoksid dismutaza (SOD) antioksidans je koji detoksificira O_2^- , što rezultira stvaranjem vodikovog peroksida (H_2O_2). Glutation peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase*, GPx) pretvara H_2O_2 u vodu. Međutim, H_2O_2 može formirati i visoko reaktivni hidroksilni radikal ($\cdot OH$) reakcijom s prijelaznim metalima (83,84). Dakle, antioksidansi su molekule koje sprječavaju interakciju oksidansa s drugim molekulama, čime se uklanja mogućnost oštećenja uz održavanje stanične redoks homeostaza (85).

Spoj mitoTEMPO je mitohondrijski antioksidans koji uklanja superoksidne i alkilne radikale (Slika 2). On je kombinacija antioksidansa piperidin nitroksida TEMPO s lipofilnim kationom trifenilfosfonijem zbog čega lako može proći kroz lipidne dvosloje i akumulirati se u mitohondrijima (86). Primjena mitoTEMPO-a na miševima s malignim melanomom i rakom pluća nije imala utjecaja na broj primarnih tumora i metastaza te nije utjecala na razinu oštećenja mitohondrijske i jezgrene DNA. U istoj je studiji ustanovljeno da primjena mitoTEMPO-a na staničnim linijama A375 i IPC-29 humanog malignog melanoma te A549 i H838 humanog karcinoma pluća nije utjecala na staničnu proliferaciju ni metabolizam (87).

Ipak, u mišjem modelu hepatokarcinogeneze, koji je razvijen intraperitonealnom primjenom N-nitrozodietilamina u mužjacima BALB/c miševa, tretman mitoTEMPO-om povećao je preživljavanje životinja i smanjio incidenciju tumora (88). Supresija glikolize u B16-F0 staničnoj liniji melanoma miša tretiranoj mitoTEMPO-om rezultirala je indukcijom stanične smrti. Primjena mitoTEMPO-a u mišjem modelu ljudskog

melanoma učinkovito je potisnula rast tumora. Ovi podaci sugeriraju da proizvodnja mitohondrijskog superoksida selektivno inhibira preživljavanje, što rezultira smrću stanica raka (89). I kod tumorskih stanica mišjeg melanoma B16F1 i B16F10 te na SiHa staničnoj liniji karcinoma pločastih stanica cerviksa mitoTEMPO je blokirao migraciju tumorskih stanica i spriječio spontane tumorske metastaze. Ovo podupire teoriju da tumorske stanice s povećanom proizvodnjom mitohondrijskog superoksida čine populaciju metastatskih progenitora, a uklanjanje mitohondrijskog superoksida bi se moglo istražiti kao terapijska opcija za sprječavanje spontanih metastaza tumora kod ljudi (90).

1.7. Antineoplastični agensi

Pemetreksed je antimetabolit koji inhibira timidilat-sintazu, dihidrofolat-reduktazu i glicinamid-ribonukleotid formiltransferazu, enzime uključene u metabolizam folata i biosintezu purinskih i pirimidinskih nukleotida. Kočenjem djelovanja važnih staničnih enzima, antimetaboliti sprečavaju sintezu i popravak DNA i ribonukleinske kiseline (engl. *ribonucleic acid, RNA*) te normalnu staničnu diobu. Pemetreksed ima antitumorsko djelovanje kod širokog raspona solidnih tumora, a posebno osjetljivi mogu biti tumori s kodelecijom gena za metiltioadenozin fosforilazu, kao posljedica delecije gena za p16 protein (91,92).

Pemetreksed se koristi kod liječenja karcinoma nemalih stanica pluća koje nisu histološki predominantno pločaste epitelne stanice, a odobren je i u kombinaciji s cisplatinom za terapiju inoperabilnih zloćudnih pleuralnih mezotelioma (91).

Cisplatin, cisplatinum ili cis-diamindikloroplatinum (II) je dobro poznati citostatik. Koristi se za liječenje brojnih karcinoma ljudi uključujući karcinom prijelaznog epitela mokraćnog mjehura, karcinom pločastih stanica područja glave i vrata, uznapredovali

ili metastatski karcinom pluća malih i nemalih stanica te metastatske tumore jajnika i testisa. Također je učinkovit protiv tumora zametnih stanica, limfoma i sarkoma (91,93). Cisplatin, kao i ostali spojevi platine koji se koriste kao antineoplastici, djeluje vezanjem na DNA i stvaranjem veza među uzvojnica (91). U citoplazmi su atomi klorida na cisplatinu istisnuti molekulama vode. Ovaj hidrolizirani proizvod je snažan elektrofil koji može reagirati s bilo kojim nukleofilom, uključujući sulfhidrilne skupine na proteinima i atome donora dušika na nukleinskim kiselinama. Cisplatin se veže za reaktivni centar N7 na purinskim ostacima te može uzrokovati oštećenje DNA i onemogućiti diobu stanica, rezultirajući apoptozom stanice (93).

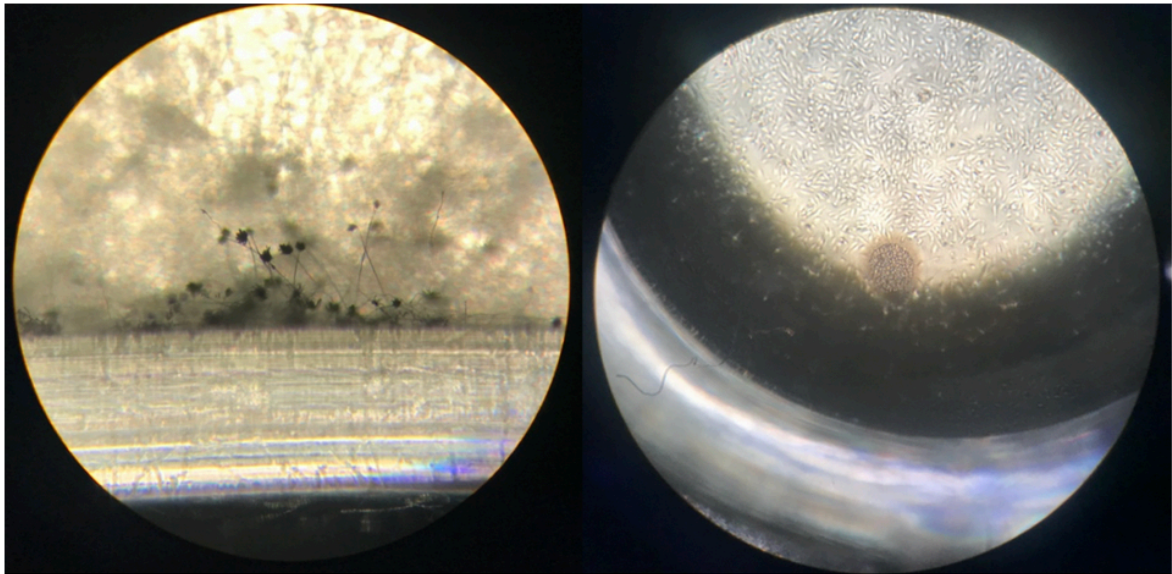
1.8. Kultura stanica

Kultura stanica tehnika je koja se često koristi u laboratorijskim istraživanjima jer omogućuje proučavanje metabolizma i fiziologije stanice što često nije moguće proučavati *in vivo* u ljudi. Ova je metoda alternativa korištenju tankih rezova tkivnih biopsija kod kojih stanice zadržavaju strukture, ali nisu vijabilne. Uzgajanje stanica u laboratorijskim uvjetima omogućuje da se nakon izolacije iz tkiva uspostavi primarna kultura koja može preživjeti od nekoliko dana do nekoliko tjedana. Stanice mogu biti dobivene iz zdravih ili iz bolestima zahvaćenih tkiva (npr. tumorska biopsija ili tkivo koje je odstranjeno tijekom operacije). Uzorci tkiva tipično su heterogeni, ali u kulturi stanica nakon nekoliko pasaža postaju uniformne stanične linije budući da pri svakom presađivanju selekcijski pritisak bira najizdržljivije jedinke. Tako su osigurani jednolični eksperimentalni uvjeti i replikati što smanjuje statističke varijacije i greške. Ipak, na ovaj se način gube neke od fenotipskih značajki tkiva od kojeg su stanice potekle. Abnormalna morfologija utječe na stanične procese kao što su: proliferacija, diferencijacija, apoptoza te genska i proteinska ekspresija. Stanice koje rastu u

jednom sloju, kao naša linija Mero-14, imaju jednoličan pristup nutrijentima i faktorima rasta tijekom razvoja (94). U ovakvim se uvjetima nekrotične stanice jednostavno odljepljuju od površine te se uklanjaju tijekom izmjene medija (94).

Stanice se mogu uzgajati u suspenzijama, nakon što ih se dispergira enzimatskom ili mehaničkom disocijacijom, ili se uzgajaju na površinama pa ih se onda naziva adherentnim kulturama, kao što je i naša. I primarne kulture i stanične linije zahtijevaju stroge, aseptične uvjete rada te kontroliranu okolinu koja vjerno oponaša uvjete u kojima bi stanice rasle *in vivo*. Velika se pažnja stoga posvećuje praćenju temperature, vlage i razine plinova (kao što su O₂ i CO₂) te regulaciji kiselosti medija i osmotskog tlaka pri uzgoju stanica (94). Iako se potpuna sterilnost ne može postići, važno je smanjiti količinu lebdećih čestica i smanjiti protok osoblja kroz laboratorij. Stroga kontrola uvjeta rasta i formulacija medija pomažu stanicama da lakše rastu budući da stanice višestaničnih organizama tipično ne rastu izolirano od ostatka organizma.

Kada se ne poštuju uvjeti rada sa staničnim kulturama dolazi do kontaminacija. Kontaminacije u staničnoj kulturi mogu biti mikrobiološke (bakterije, gljivice, mikoplazme, virusi i dr.) i kemijske (endotoksini, slobodni radikali, deterdženti, teški metali i dr.) (95). Posebno su problematične kontaminacije koje nemaju lako mjerljivih posljedica ili učinaka koji su vidljivi golim okom. Dok se kontaminacije bakterijama, gljivicama i plijesnima mogu otkriti vizualnom inspekcijom, mikoplazme i virusi često mogu ostaviti male i teško primijetne tragove na makroskopskoj i mikroskopskoj razini i tek se npr. PCR metodom mogu detektirati (95).



Slika 3. Kontaminacije u staničnoj kulturi. Lijevo – plijesni, Desno – moguća zaraza gljivicama.

2. Hipoteza

Visoka koncentracija glukoze potiče ekspresiju gena *SOX2* i *NANOG* u mezoteliomskoj staničnoj liniji Mero-14 i povećava vijabilnost stanica, dok inhibitori mitohondrijskog energijskog metabolizma i mitohondrijski antioksidans poništavaju ovaj učinak.

3. Ciljevi rada

Opći cilj ovog rada je istražiti kako visoke koncentracije glukoze i inhibitori mitohondrijskog energijskog metabolizma utječu na ekspresiju gena pluripotentnosti, *SOX2* i *NANOG*-a i otpornost stanica na antineoplastične agense.

Specifični ciljevi:

Cilj 1. Istražiti utjecaj visoke koncentracije glukoze na ekspresiju gena *SOX2* i *NANOG* i proteina *SOX2* i *NANOG* u mezoteliomskoj staničnoj liniji Mero-14.

Cilj 2. Testirati utjecaj inhibitora mitohondrijskog energijskog metabolizma pojedinačno ili zajedno s visokom koncentracijom glukoze, na ekspresiju gena *SOX2* i *NANOG* i proteina *SOX2* i *NANOG*, u stanicama Mero-14.

Cilj 3. Istražiti otpornost mezoteliomskih stanica Mero-14 na antineoplastične agense nakon tretmana visokom koncentracijom glukoze s ili bez inhibitora mitohondrijskog energijskog metabolizma.

4. Materijali i metode

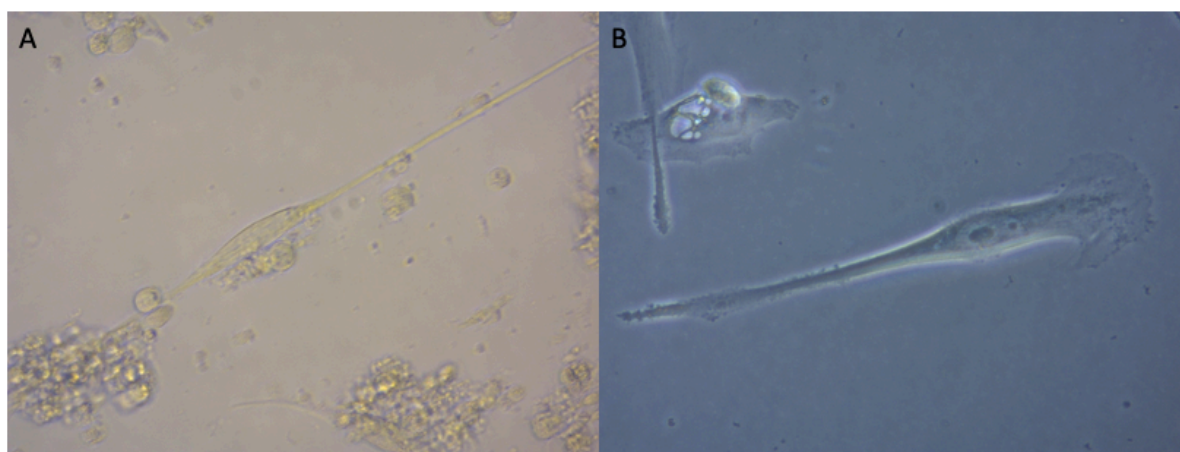
4.1. Modifikatori mitohondrijskog energijskog metabolizma i mitohondrijski antioksidans

Modifikatori mitohondrijskog energijskog metabolizma koji su korišteni u ovom istraživanju molekule su koje specifično djeluju (inhibiraju ili aktiviraju) na pojedine procese u metabolizmu glukoze i njenih razgradnih produkata u mitohondrijima. Spoj UK 5099 korišten je kao inhibitor mitohondrijskog prijenosnika piruvata dok je DNP korišten zbog svoje sposobnosti da raspreže oksidativnu fosforilaciju. Nasuprot tome, DCA inhibira PDH te je korišten kako bi se pojačala aktivnost metaboličkog puta koji dovodi do oksidacije glukoze. Spoj mitoTEMPO korišten je za smanjenje koncentracije mitohondrijskog ROS-a. Modifikatori mitohondrijskog metabolizma korišteni su u dvije koncentracije, višoj i nižoj, i to: UK 5099 (5 μ M i 100 μ M), DNP (5 μ M i 25 μ M) i DCA (100 μ M i 2 000 μ M). mitoTEMPO je korišten u jednoj koncentraciji od 20 μ M jer su testovi titracije pokazali jednak učinak u višim i nižim koncentracijama, za razliku od UK 5099, DNP-a i DCA-a.

Kako bi se istražila otpornost mezoteliomskih stanica na antineoplastične agense, nakon tretmana visokom koncentracijom glukoze s ili bez modifikatora mitohondrijskog energijskog metabolizma, u ovoj disertaciji je testirano i uspoređeno odumiranje stanica kao odgovor na različite koncentracije antineoplastičnih agensa pemetrekseda i cisplatine, što je standardna terapija u liječenju mezotelioma pleure. Cisplatin i pemetreksed su korišteni u omjeru 1:4 (25 μ M i 100 μ M).

4.2. Stanična linija Mero-14

Kao model mezotelioma korištena je stanična linija Mero-14 (Slika 4) porijeklom iz pleuralnog izljeva muškog pacijenta starijeg od 60 godina s poviješću izloženosti azbestu (European Collection of Authenticated Cell Cultures, 09100101, lot no. 16C003). Stanice su uzgajane po preporuci proizvođača u mediju Ham's F-10 (Sigma, SAD) uz dodatak 15 % fetalnog telećeg seruma (Sigma, SAD) u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C s vlažnom atmosferom zraka koja sadrži 5 % CO₂.

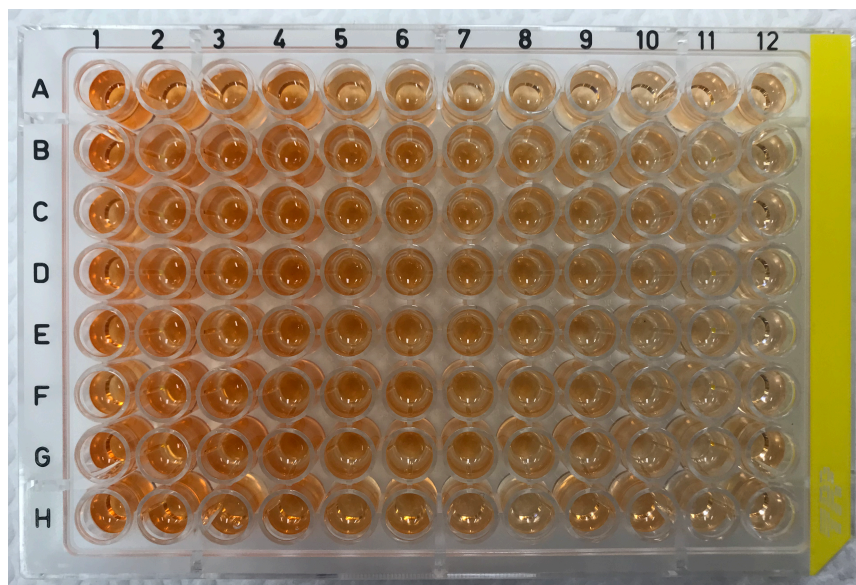


Slika 4. Stanice Mero 14 snimljene svjetlosnim mikroskopom. A. Povećanje 200x. B. Fazni kontrast, povećanje 400x.

Sve stanice, prije pokusa, uzgajane su u bocama od 25 cm² i 75 cm². Za svaki pokus, adherentna kultura konfluentnih stanica odvojena je od podloge s 0.25 % otopinom tripsina s dodatkom etilendiamintetraoctene kiseline (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA*; Lonza, Švicarska) tijekom 1 minute te se broj vijabilnih stanica odredio metodom bojenja tripanskim modrilom na hemocitometru tipa Neubauer. Nakon brojanja stanice su bile nasađene u pločice sa 6, 24 ili 96 bunarića, ovisno o vrsti pokusa.

Proliferacija stanica kvantificirana je EZ4U testom (Biomedica, Austrija). Ova metoda koristi tetrazolijeve soli, nativno žute boje, koje se reduciraju u crveni formazan u funkcionalnim mitohondrijima unutar žive stanice. Budući da su mitohondriji inaktivirani već nekoliko minuta nakon smrti stanice, ova metoda je dobar alat za razlikovanje živih i mrtvih stanica, a prema intenzitetu obojenja odražava brojnost živih stanica.

Proliferacijski testovi korišteni su kako bi se ispitaio utjecaj različitih koncentracija glukoze i modifikatora mitohondrijskog prijenosnika piruvata te su prema tim rezultatima utvrđene koncentracije na kojima su se provela daljnja istraživanja. Tretmani stanica u istraživanju provodili su se prvi, drugi i treći dan pokusa, a četvrtog dana analizirane su promjene nastale na genskoj i proteinskoj razini. Raspored tretmana u istraživanju utvrđen je prema rezultatima pilot studije.



Slika 5. Test stanične proliferacije.

Test stanične proliferacije izveden je na stanicama Mero-14 nakon razdoblja kultivacije od 4 dana. Volumen od 20 μ l otopine boje dodan je u svaku jažicu i pločice

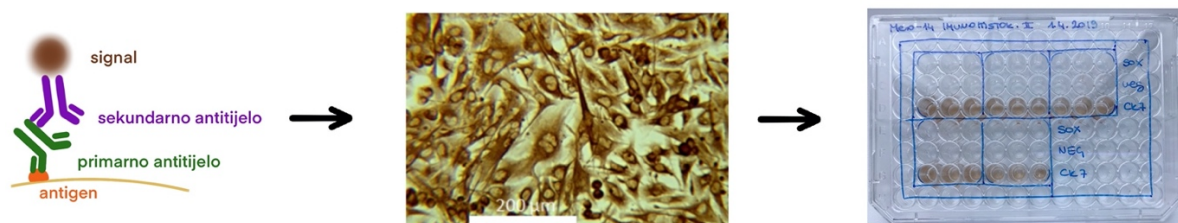
su potom inkubirane na 37 °C jedan sat. Ovo vremensko razdoblje je dovoljno da se proizvede značajno povećanje intenziteta boje (Slika 5). Pomoću čitača mikropločica, apsorbancija je očitana na 492 nm valne duljine sa 620 nm valne duljine kao referentnom vrijednošću.

4.3. Imunocitokemija

Kako bi se odredio izražaj proteina SOX2 i NANOG, na tretiranim stanicama korištena je metoda imunocitokemije. Imunocitokemija je tehnika u kojoj se koriste specifična antitijela za detekciju i vizualizaciju proteina i drugih antigena u stanici. Za razliku od imunohistokemije gdje se analiziraju stanice u tankim prerezima tkiva, imunocitokemija se koristi za bojanje stanica uzgojenih u kulturi ili stanica koje su izolirane iz tkiva, krvi ili briseva.

Za potrebe naših pokusa, adherentne stanice Mero-14 uzgajane su u pločicama s 96 jažica. Nakon tretmana prvog, drugog i trećeg dana pokusa, četvrti dan su stanice fiksirane metilnim alkoholom. Fiksacija zadržava proteine na njihovoj prvotnoj lokaciji u stanici i čuva njihovu kemijsku strukturu u trenutku fiksacije. Stanice su zatim inkubirane s primarnim antitijelima kako bi se omogućilo njihovo vezanje na željeni antigen, dok se nevezana antitijela odstranjuju ispiranjima.

Kraj imunocitokemijskog bojenja podrazumijeva vizualizaciju. Za imunohistokemiju postoje različiti reporteri koji se mogu koristiti. Za potrebe ovih pokusa koristili smo antitijela vezana za enzim koji, nakon što se doda supstrat, katalizira reakciju u kojoj nastaje obojani produkt na mjestu gdje se enzim povezoao s antitijelom na stanici. Enzim peroksidaza hrena (engl. *horseradish peroxidase*, *HRP*) pretvara 3,3'-diaminobenzidin (DAB) u smeđi precipitat koji se lako detektira svjetlosnom mikroskopijom (Slika 6).



Slika 6. Imunocitokemija. Imunološka reakcija stvara signal koji se u jačim reakcijama vidi i golim okom.

Korištena je metoda indirektna detekcije koja podrazumijeva da se na proteine od interesa prvo veže neobilježeno primarno antitijelo, a zatim sekundarno antitijelo upareno s enzimom HRP-a. Ovakav način obilježavanja molekula je osjetljiviji od direktne detekcije zato što se na primarno može vezati više sekundarnih antitijela te se na taj način signal amplificira. Također, sekundarno antitijelo veže se za konstantnu regiju primarnog antitijela i na taj se način jednim sekundarnim antitijelom mogu označiti sva korištena primarna antitijela koja potječu iz iste vrste. Ipak, za razliku od direktne detekcije, ovaj je postupak dugotrajniji te postoji mogućnost nespecifičnog vezanja sekundarnog antitijela.

U ovim su pokusima korištena primarna antitijela (Abcam, Ujedinjeno Kraljevstvo) anti-SOX2 (razrjeđenje 1:200) i anti-NANOG (razrjeđenje 1:100) uz EnVision FLEX sustav (Agilent, SAD) i sekundarno antitijelo EnVision (Agilent, SAD). Za vizualizaciju željenih biljega, prema uputama proizvođača, kao kromogen korišten je DAB.

Stanice su četvrtog dana pokusa fiksirane ledenim metilnim alkoholom. Nakon ispiranja, stanice su pet minuta inkubirane u 50 μ L peroksidaznog bloka, a zatim su ponovno isprane i inkubirane sat vremena u 50 μ L primarnog antitijela. Kao negativna

kontrola korištena je 3 % otopina goveđeg serumskog albumina, a pozitivna kontrola bila su antitijela koja se vežu na vimentin i citokeratin 7. Nakon ispiranja primarnih antitijela, stanice su inkubirane 30 minuta u sekundarnom antitijelu, a potom bojena DAB-om 1 min.

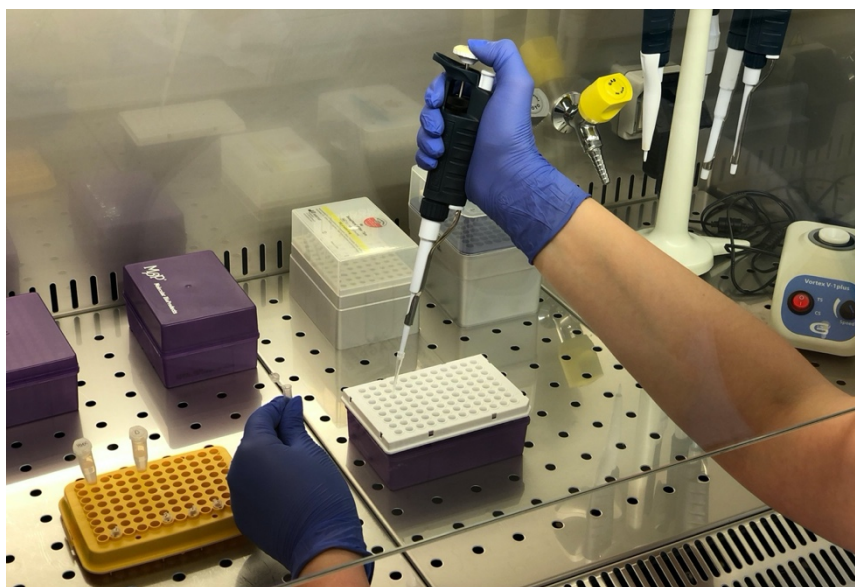
Stanice su slikane mikroskopom EVOS Imaging System (Thermo Fisher Scientific, SAD). Dobivene slike stanica analizirane su pomoću programa ImageJ (National Institutes of Health, SAD).

4.4. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom

Za reverznu transkripciju korišten je kit za reverznu transkripciju High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD). Reakcijska smjesa bila je sastavljena od: 1 µg RNA, 2 µL pufera za reverznu transkripciju, 2 µL nasumičnih početnica za reverznu transkripciju, 0.8 µL mješavine deoksinukleotida, 1 µL MultiScribe reverzne transkriptaze, 1 µL inhibitora RNAza i destilirane vode bez RNAza/DNAza do konačnog volumena od 20 µL. Reakcija je napravljena u stroju ProFlex PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD) prema programu: 10 min na 25 °C; 120 min na 37 °C; 5 min na 85 °C; ∞ na 4°C.

Sintetizirana komplementarna DNA (engl. *complementary deoxyribonucleic acid*, *cDNA*) iskorištena je za analizu kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraza u stvarnom vremenu (engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*, *qRT-PCR*). Korišten je uređaj Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD) s pripadajućim programom prema uputama proizvođača. Kako bi se smanjila mogućnost greške u usporedbi i analizi uzoraka, korištena je endogena kontrola, RPLP0 (Applied Biosystems, Thermo Fisher

Scientific, Massachusetts, SAD), odnosno kontrolni gen (engl. *housekeeping gene*) koji je služio za normalizaciju rezultata. Analizirana je relativna ekspresija istraživanih (ciljanih) gena, *SOX2* i *NANOG* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD), u odnosu na ekspresiju endogene kontrole. Reakcijska smjesa za jedan uzorak sastojala se od 8 μ L destilirane vode bez RNAza/DNAza, 10 μ L TaqMan Gene Expression Master Mix (2x; Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD), 1 μ L TaqMan Gene Expression Assay (20x; Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD) i 1 μ L cDNA (Slika. 7). Reakcije su napravljene u duplikatu, a prosječna vrijednost je korištena za statističke analize i prikaz rezultata.



Slika 7. Priprema pločice za qPCR.

Kako bi se odredile razlike u ekspresiji, uspoređene su razine ekspresije istraživanih gena u uzorcima tretiranih i netretiranih stanica uzgajanih u kulturi. Korištena je $\Delta\Delta$ Ct metoda koja koristi formulu $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Ct (engl. *threshold cycle*), odnosno Cp (engl. *crossing point*) vrijednost označava broj ciklusa koji je potreban da

fluorescencija signalnih molekula testa za sekvenciju određenog gena, povezana s njenom amplifikacijom, dosegne prag detekcije. Ct vrijednost je obrnuto proporcionalna početnoj količini amplikona u uzorku.

Konačni se rezultat prikazuje kao $2^{-\Delta Ct}$ vrijednost odnosno faktor promjene ekspresije gena (engl. *fold-change*), broj koji označava koliko puta je promijenjena ekspresija gena ispitivanog uzorka u odnosu na kontrolni uzorak (96).

$$\Delta Ct = Ct (\text{ciljanog gena}) - Ct (\text{referentnog gena})$$

$\Delta\Delta Ct$ označava razliku Ct vrijednosti tretiranog i kontrolnog uzorka, uzevši u obzir njihove ciljane i referentne gene:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{ispitivanog uzorka}) - \Delta Ct (\text{kontrolnog uzorka})$$

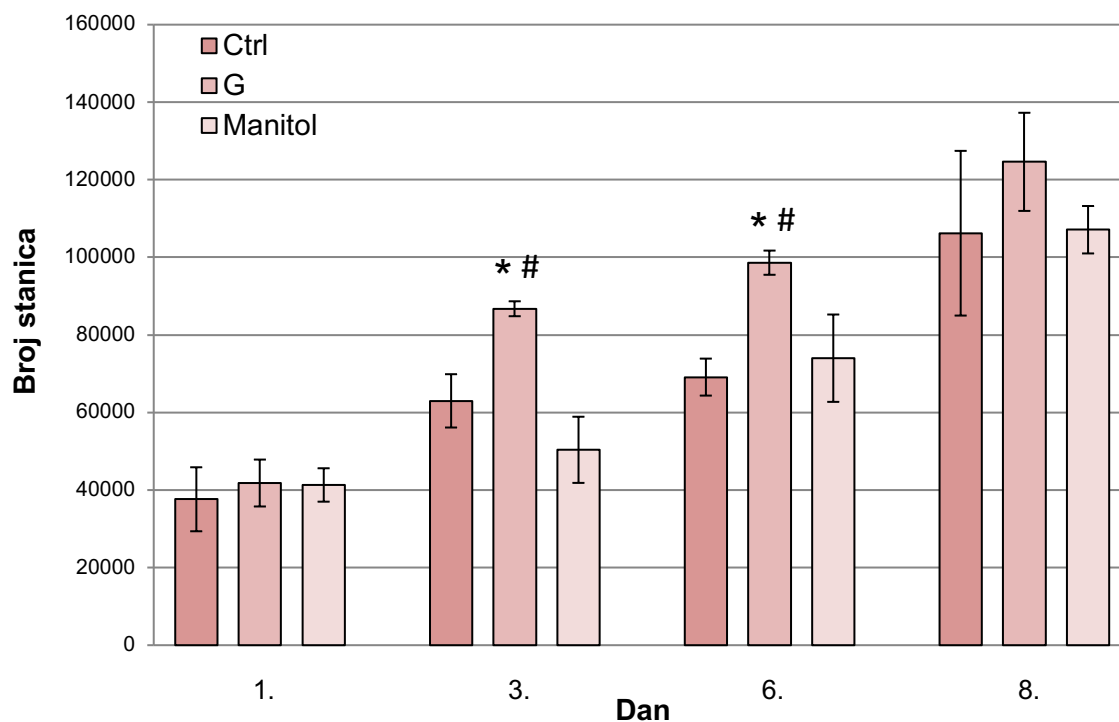
4.5. Statistička analiza

Za statističku obradu dobivenih podataka korišten je program Statistica. Podaci su prezentirani grafički kao srednja vrijednost za svaki od tretmana zasebno. Statistička usporedba izvedena je koristeći jednosmjerne analize varijanci (ANOVA) uz Tukeyev post hoc test.

5. Rezultati

5.1. Visoka koncentracija glukoze i DCA mijenjaju proliferaciju stanica mezotelioma

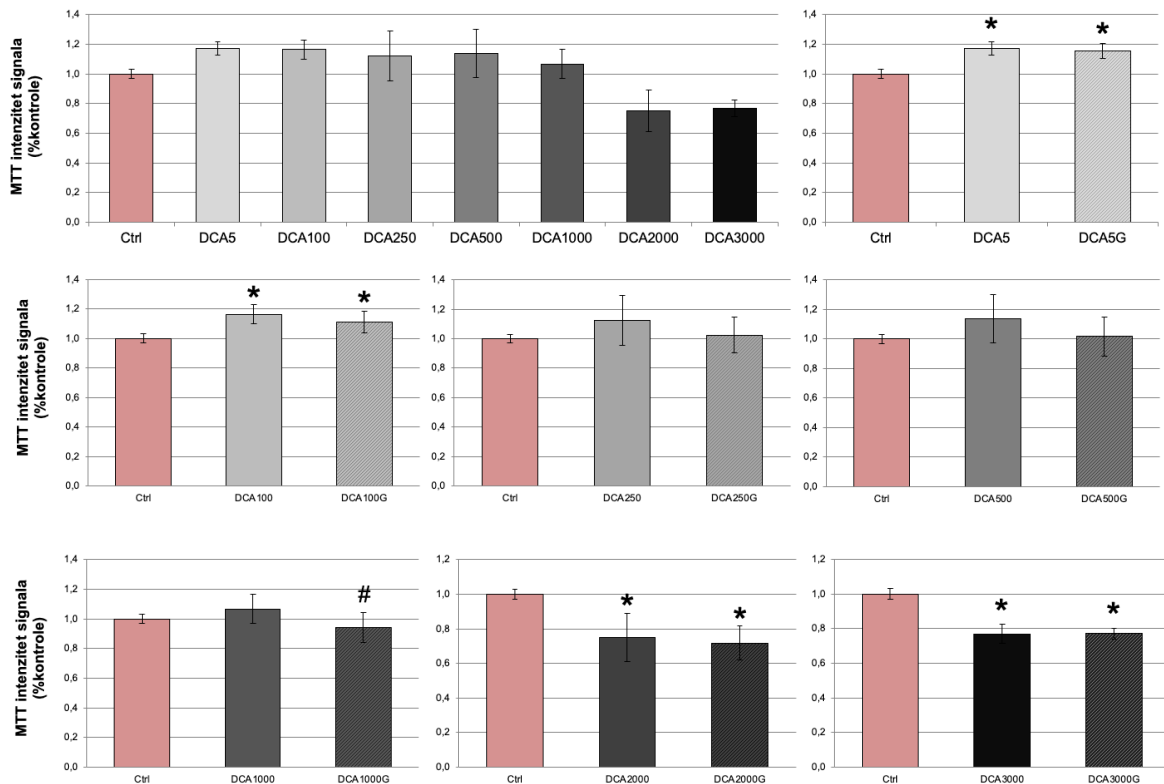
Da bi se istražilo mogu li promjene u mitohondrijskom metabolizmu utjecati na proliferaciju stanica mezotelioma, testirani su učinci nekoliko poznatih modifikatora mitohondrijskog metabolizma UK 5099, DNP i DCA te visoke koncentracije glukoze. ROS nastao u mitohondriju eliminiran je mitoTEMPO-m. Visoka razina glukoze povećala je proliferaciju Mero-14 stanica tijekom trodnevnog i šestodnevnog tretmana u usporedbi s netretiranim, kontrolnim stanicama i hiperosmotskom otopinom manitola (5 mM glukoze + 15 mM manitola; Slika 8). To je pokazalo da metabolizam visoke koncentracije glukoze, a ne hiperosmolarnost, pojačava proliferaciju stanica mezotelioma. U svim ostalim eksperimentima analizirali smo staničnu proliferaciju četvrtog dana tretmana.



Slika 8. Usporedba proliferacije stanica tretiranih glukozom ili manitolom. Broj stanica određen je MTT esejem. U usporedbi s kontrolom (Ctrl) i tretmanom manitolom (5 mM glukoza + 15 mM manitol; hiperosmotska kontrola), tretman visokom koncentracijom glukoze (20 mM; G) značajno je povećao proliferaciju 3. i 6. dana. Prikazane su srednje vrijednosti svih podataka u pojedinoj pokusnoj skupini \pm SD (n=4). Oznake statističke značajnosti: * $P < 0.05$ prema Ctrl; # $P < 0.05$ prema Manitol.

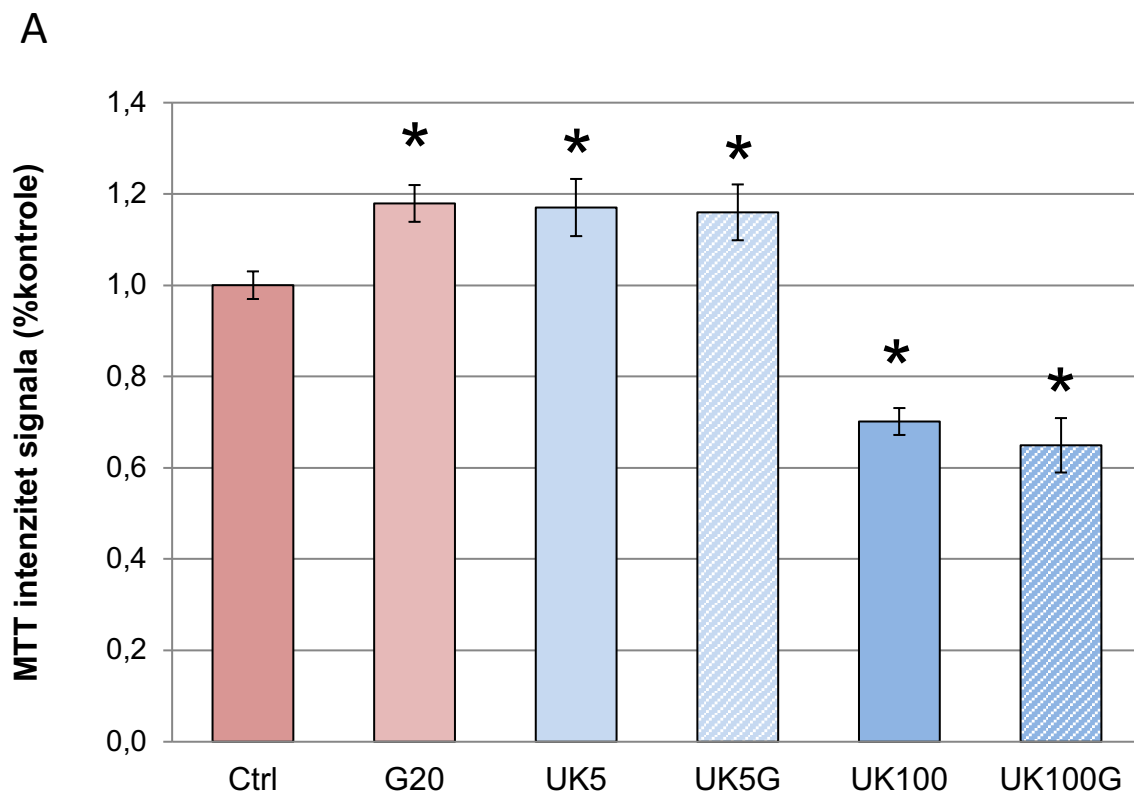
DCA je pokazao dvofazni učinak na proliferaciju stanica mezotelioma. U nižim koncentracijama inducirao je proliferaciju, ali ju je potisnuo u višim koncentracijama, što ukazuje na složeni učinak DCA na proliferaciju stanica mezotelioma (Slika 9). Kombinacija 1000 μ M DCA i visoke koncentracije glukoze značajno je smanjila proliferaciju stanica nego sam DCA. Za nekoliko drugih ispitanih koncentracija srednjeg raspona dodavanje visoke koncentracije glukoze također je pokazalo trend

smanjenja stanične proliferacije u usporedbi s DCA tretmanom. To sugerira potencijalni sinergistički učinak, pri čemu je DCA omogućio veću oksidaciju piruvata, a visoka razina glukoze stimulirala veću proizvodnju piruvata i tako spriječila stimulaciju proliferacije, odnosno potencirala citotoksični učinak DCA-a .

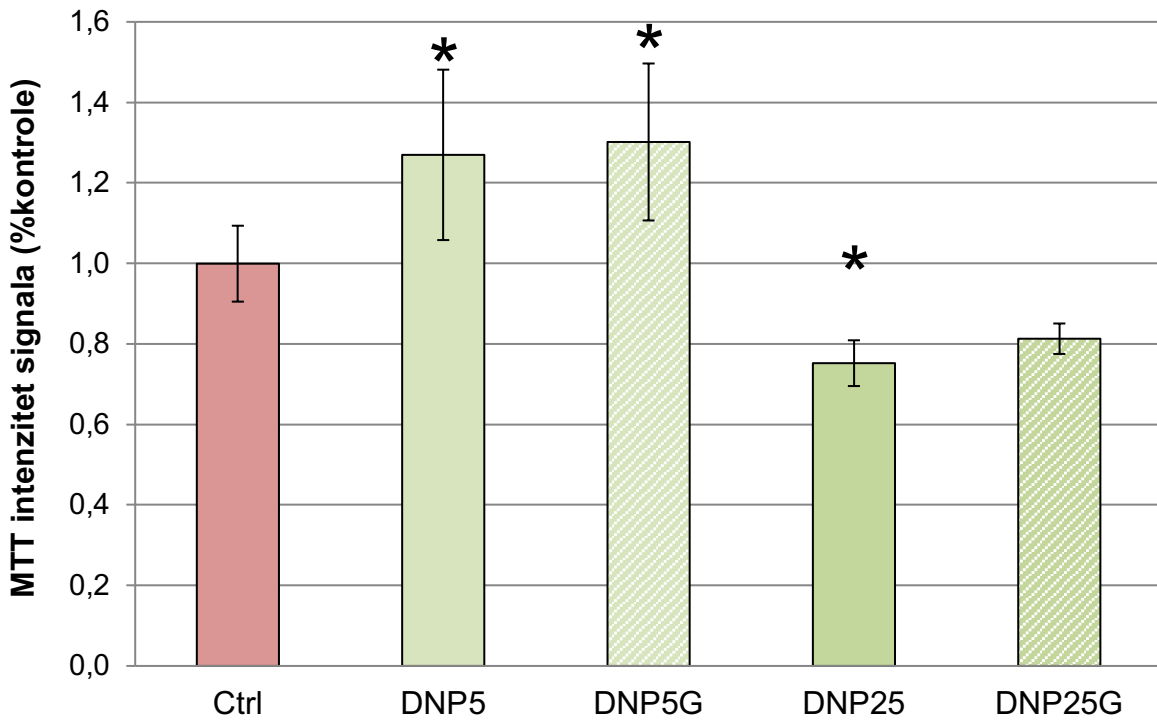


Slika 9. Usporedba proliferacije Mero-14 stanica tretiranih različitim koncentracijama DCA-a. U svim grafovima, brojka dodana pojmu DCA označava koncentraciju DCA u μM , a slovo „G“ označava dodatak 20 mM glukoze. Na primjer, DCA 5G označava tretman s 5 μM DCA i 20 mM glukozom. Prikazane su srednje vrijednosti svih podataka u pojedinoj pokusnoj skupini \pm SD (n=6). Oznake statističke značajnosti: * $P < 0.05$ prema Ctrl; # $P < 0.05$ prema tretman s G.

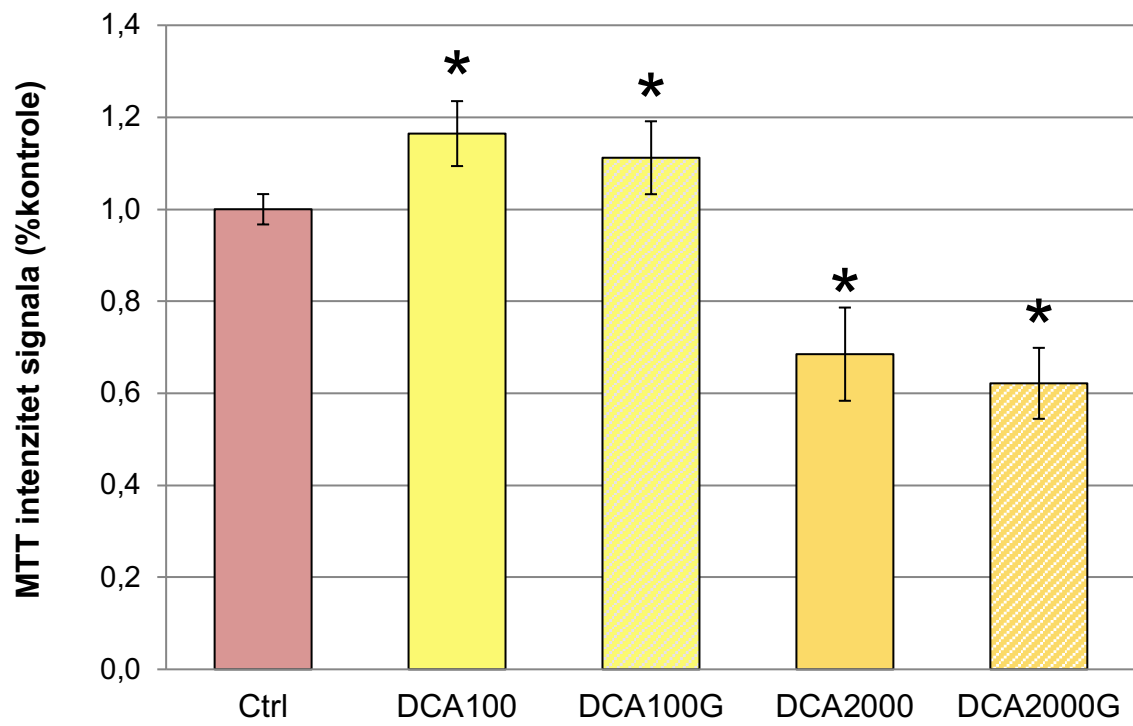
Slično DCA titraciji, provedena je titracija UK 5099, DNP-a i mitoTEMPO-a (podaci nisu prikazani). Kao i za DCA, i DNP i UK 5099 su pokazali stimulacijski učinak u nižoj i inhibitorni učinak u višoj koncentraciji. Za daljnje eksperimente odabrane su pojedinačne niske i visoke doze koje su stimulirale, odnosno potisnule staničnu proliferaciju, prema provedenmm titracijskim pokusima.



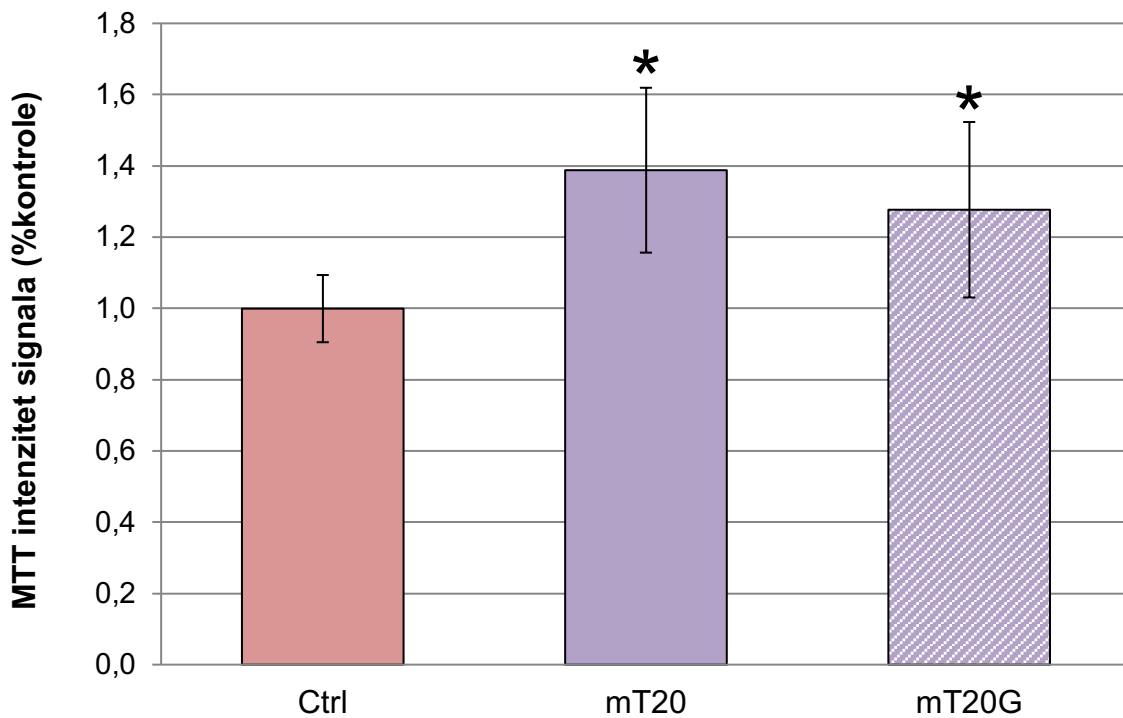
B



C



D



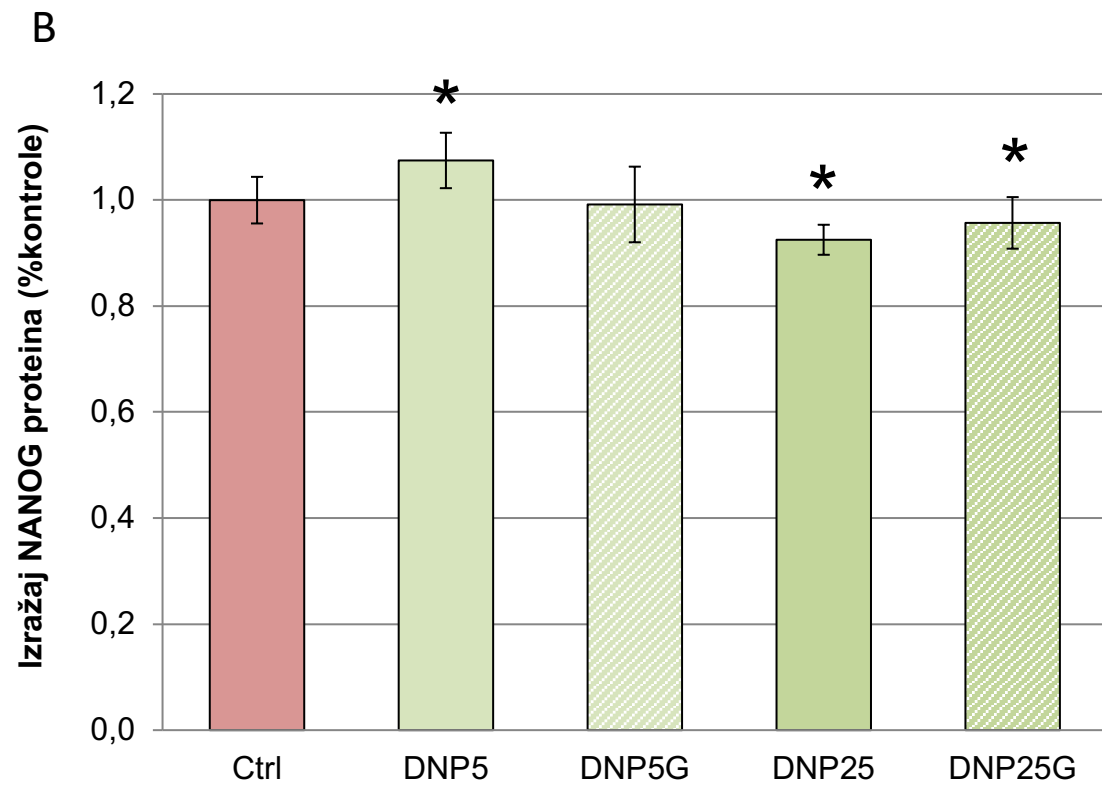
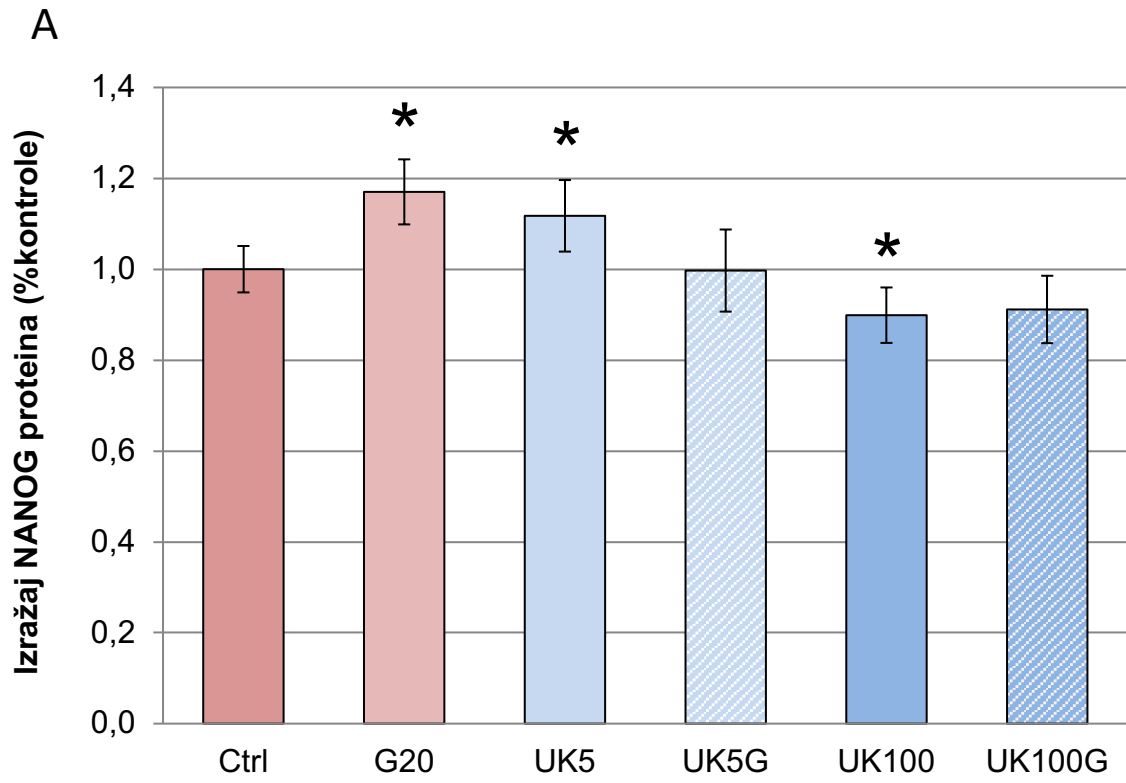
Slika 10. Usporedba proliferacije Mero-14 stanica tretiranih molekulama: A. UK 5099, B. DNP, C. DCA, D. mitoTEMPO. U svim grafovima, brojka dodana kratici označava koncentraciju tretmana u μM , a slovo „G“ označava dodatak 20 mM glukoze. Na primjer, DCA100G označava tretman s 100 μM DCA i 20 mM glukozom. Prikazane su srednje vrijednosti svih podataka u pojedinoj pokusnoj skupini \pm SD ($n=6$). Oznake statističke značajnosti: * $P < 0.05$ prema Ctrl.

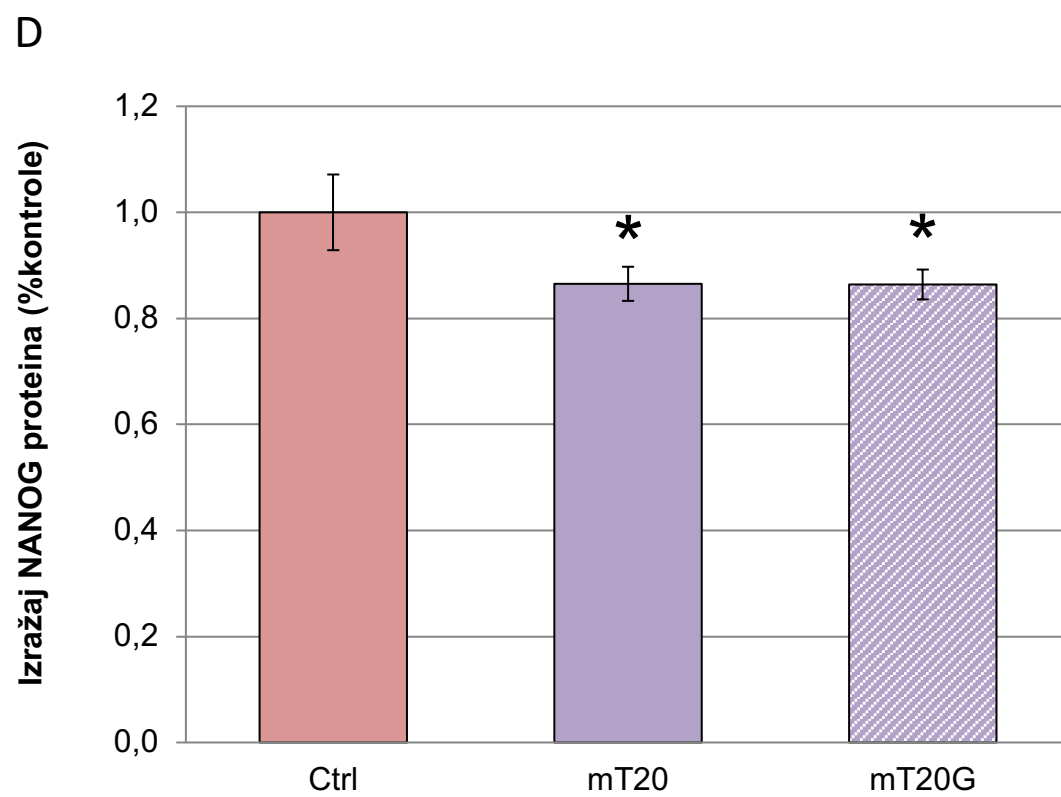
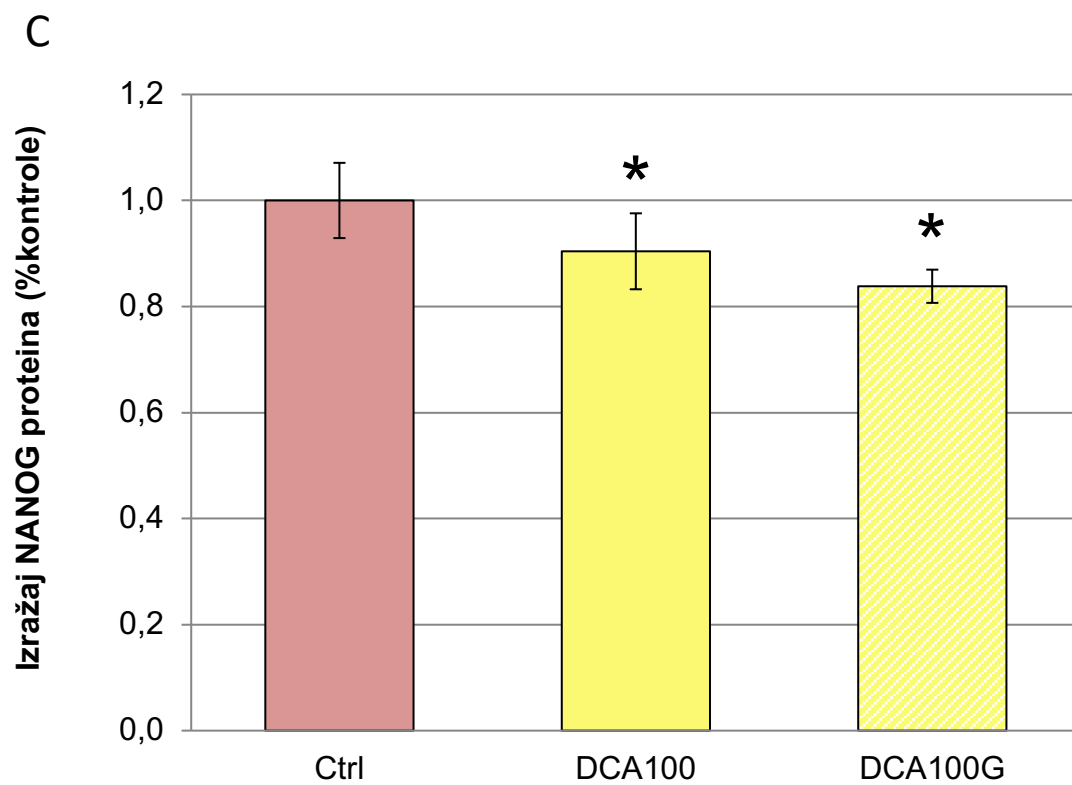
UK 5099 i DNP stimulirali su proliferaciju stanica mezotelioma pri nižim koncentracijama i smanjili je pri višim koncentracijama (Slika 11. A i B). Ovaj dvofazni učinak bio je sličan odgovoru na DCA. To je pokazalo da umjerene promjene u mitohondrijskom metabolizmu pri nižim koncentracijama UK 5099 i DNP-a mogu potaknuti proliferaciju stanica mezotelioma, ali da značajne modifikacije mitohondrijskog metabolizma pri višim koncentracijama UK 5099 i DNP-a potiskuju

proliferaciju Mero-14 stanica. Dodavanje glukoze u visokoj koncentraciji nije promijenilo učinke UK 5099 ili DNP-a u testiranim koncentracijama. Konačno, mitoTEMPO, mitohondrijski antioksidans nije pokazao dvofazni učinak. On je pojačao proliferaciju, s ili bez glukoze, što sugerira da superoksid potiskuje proliferaciju Mero-14 stanica.

5.2. Modifikatori mitohondrijskog energijskog metabolizma mijenjaju ekspresiju NANOG proteina

Testirali smo utječu li modifikatori mitohondrijskog metabolizma na ekspresiju NANOG proteina. Slično eksperimentima sa staničnom proliferacijom, visoka razina glukoze inducirala je ekspresiju NANOG proteina, dok su UK 5099 i DNP pojačavali ekspresiju NANOG proteina pri nižim koncentracijama i smanjivali je pri višim koncentracijama (Slika 11). Dodatak visoke koncentracije glukoze je poništio stimulacijski učinak UK 5099 i DNP-a na Mero-14 stanice. DCA je inhibirao ekspresiju NANOG proteina, kao i mitoTEMPO. Modifikacija mitohondrijskog metabolizma višim i nižim koncentracijama UK 5099, DNP-a i DCA-a je pokazala sličan obrazac izražaja NANOG proteina i obrazac proliferacije stanica mezotelioma, većinom stimulaciju u nižim i inhibiciju u višim koncentracijama. Ovo sugerira povezanost izražaja NANOG proteina i proliferacije mezoteliomskih stanica.





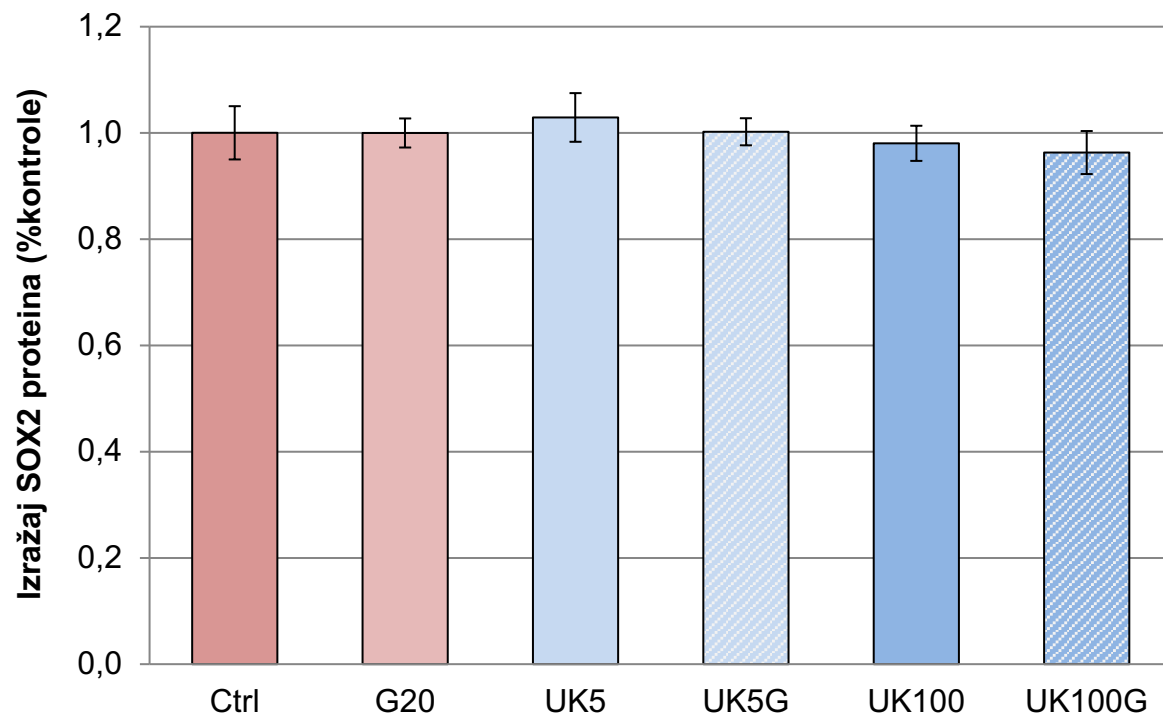
Slika 11. Usporedba izražaja NANOG proteina u Mero-14 stanicama tretiranim

molekulama: A. UK 5099, B. DNP, C. DCA, D. mitoTEMPO. U svim grafovima, brojka dodana kratici označava koncentraciju tretmana u μM , a slovo „G“ označava dodatak 20 mM glukoze. Na primjer, DCA100G označava tretman s 100 μM DCA i 20 mM glukozom. Prikazane su srednje vrijednosti svih podataka u pojedinoj pokusnoj skupini \pm SD (n=9). Oznake statističke značajnosti: * $P < 0.05$ prema Ctrl.

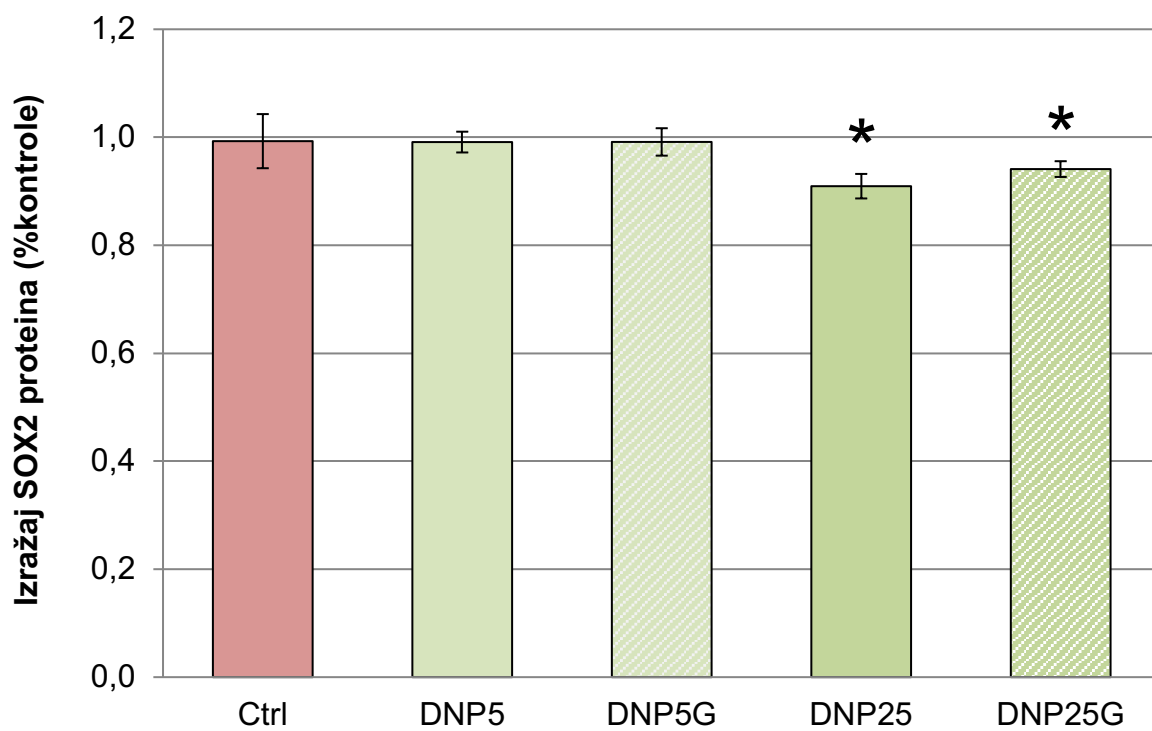
5.3. Modifikatori mitohondrijskog energijskog metabolizma mijenjaju ekspresiju SOX2 proteina

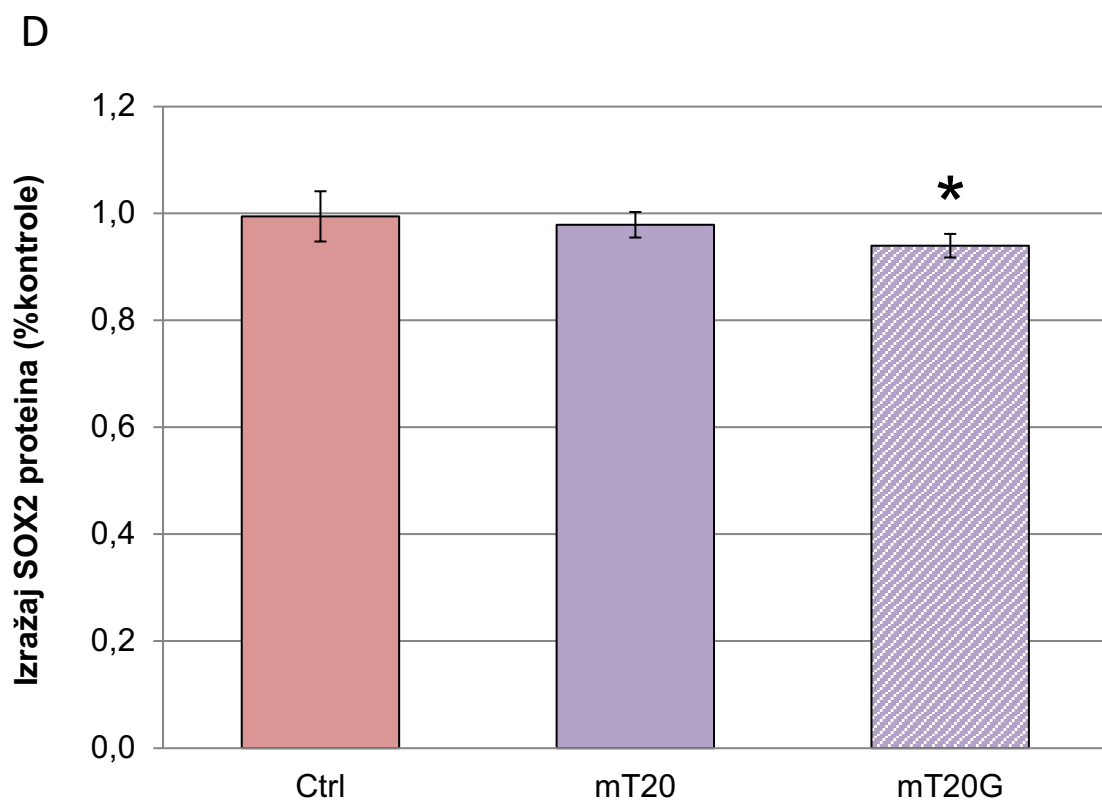
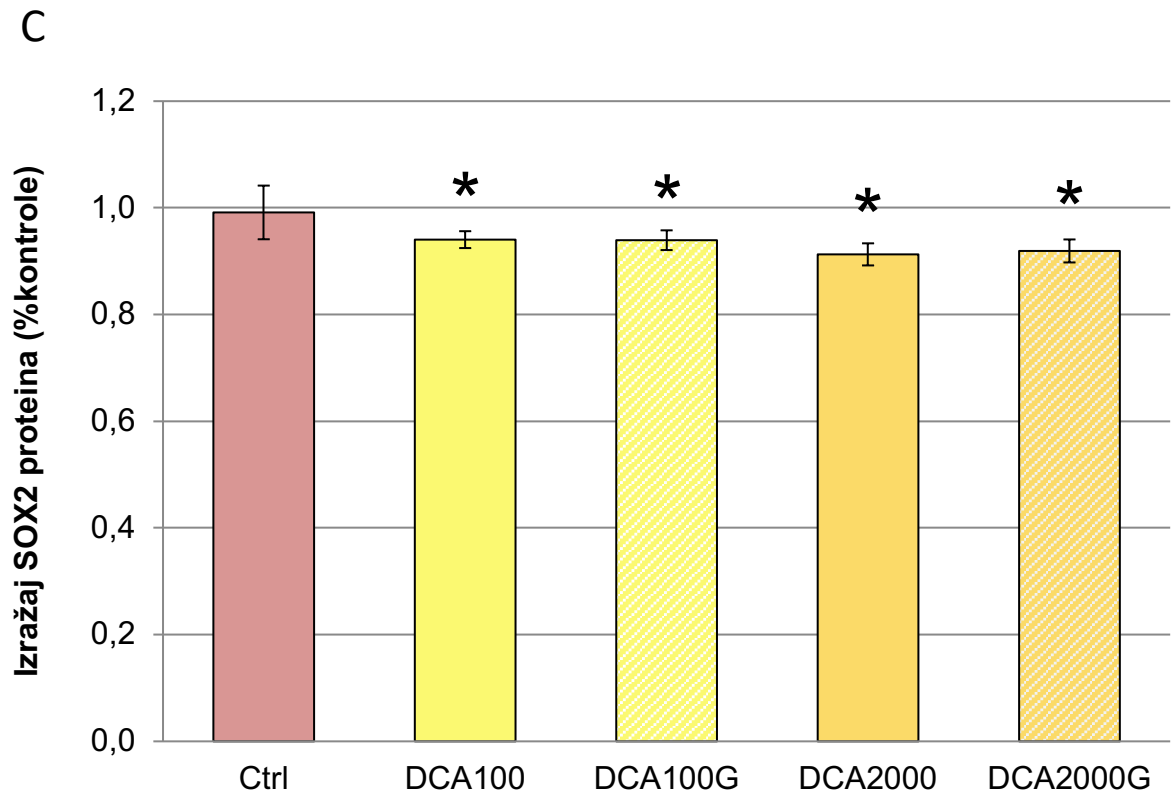
S obzirom da je SOX2 čimbenik pluripotencije četiri puta više izražen u mezoteliomu nego u zdravom mezotelu te da povećan izražaj ovog čimbenika pluripotencije odgovara pojavi tumorskih matičnih stanica, odnosno agresivnijem ponašanju tumora, testirali smo i izražaj SOX2 proteina i gena (97,98). SOX2 protein je pokazao drugačiji obrazac izražaja od NANOG proteina u odgovoru na modifikaciju mitohondrijskog metabolizma (Slika 12). UK 5099 i visoka koncentracija glukoze nisu značajnije mijenjali izražaj SOX2 proteina. Za razliku od toga, DNP je blago, ali značajno snizio koncentraciju SOX2 proteina. DCA je u višoj i nižoj koncentraciji umjereno, ali značajno snizio koncentraciju SOX2 proteina. Dodavanje visoke koncentracije glukoze DNP-u i DCA-u nije značajno mijenjao izražaj SOX2 proteina. Iako sam mitoTEMPO nije značajno mijenjao izražaj SOX2 proteina u usporedbi s kontrolom, dodatak visoke koncentracije glukoze je rezultirao sniženjem izražaja SOX2 proteina.

A



B





Slika 12. Usporedba izražaja SOX2 proteina u Mero-14 stanicama tretiranim

molekulama: A. UK 5099, B. DNP, C. DCA, D. mitoTEMPO. U svim grafovima, brojka dodana kratici označava koncentraciju tretmana u μM , a slovo „G“ označava dodatak 20 mM glukoze. Na primjer, DCA100G označava tretman s 100 μM DCA i 20 mM glukozom. Prikazane su srednje vrijednosti svih podataka u pojedinoj pokusnoj skupini \pm SD (n=8). Oznake statističke značajnosti: * $P < 0.05$ prema Ctrl.

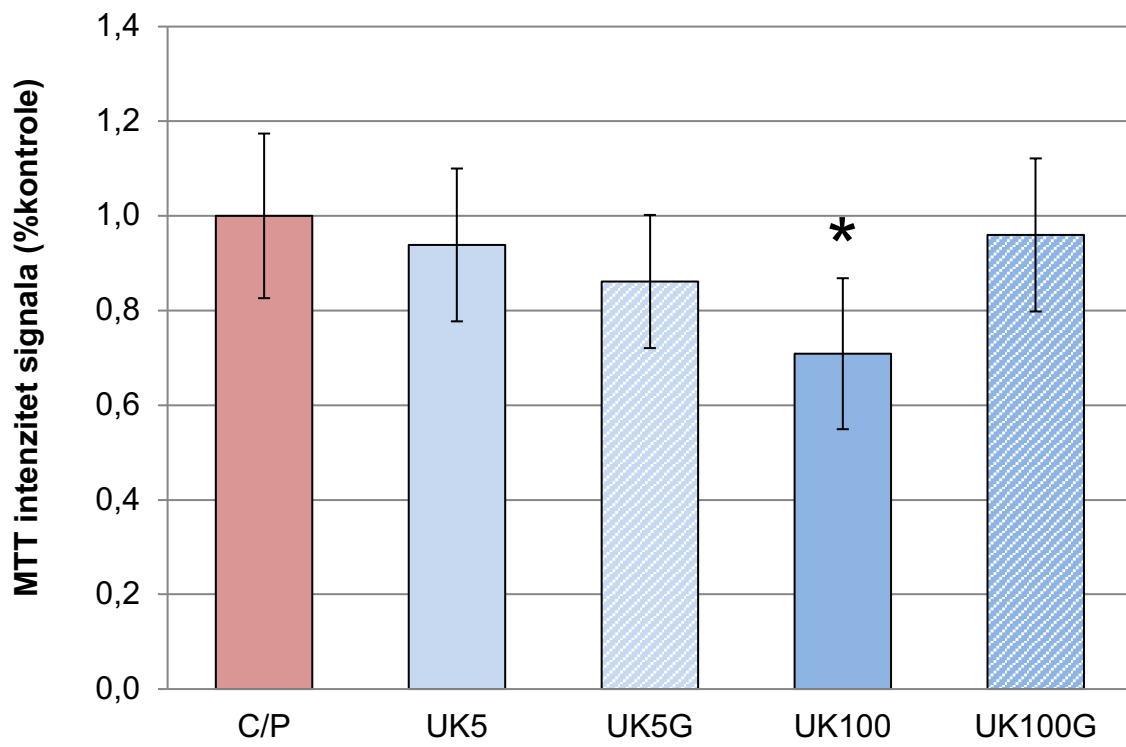
5.4. Učinak modifikatora mitohondrijskog energijskog metabolizma na citotoksičnost cisplatine i pemetrekseda

Testirali smo mogu li visoka koncentracija glukoze, UK 5099, DNP-a i DCA-a promijeniti učinke kombinacije cisplatine i pemetrekseda (C/P), što je standardna kemoterapija za mezoteliom. Dodatak same glukoze nije značajno promijenio citotoksični učinak C/P-a (Slika 13). Zanimljivo je da ni UK 5099, ni DNP ni DCA nisu pokazali učinak na proliferaciju stanica kada su se primijenili u nižim koncentracijama. Naime, nije bilo razlika između citostatika C/P i citostatika C/P u kombinaciji s niskim dozama ovih mitohondrijskih modifikatora.

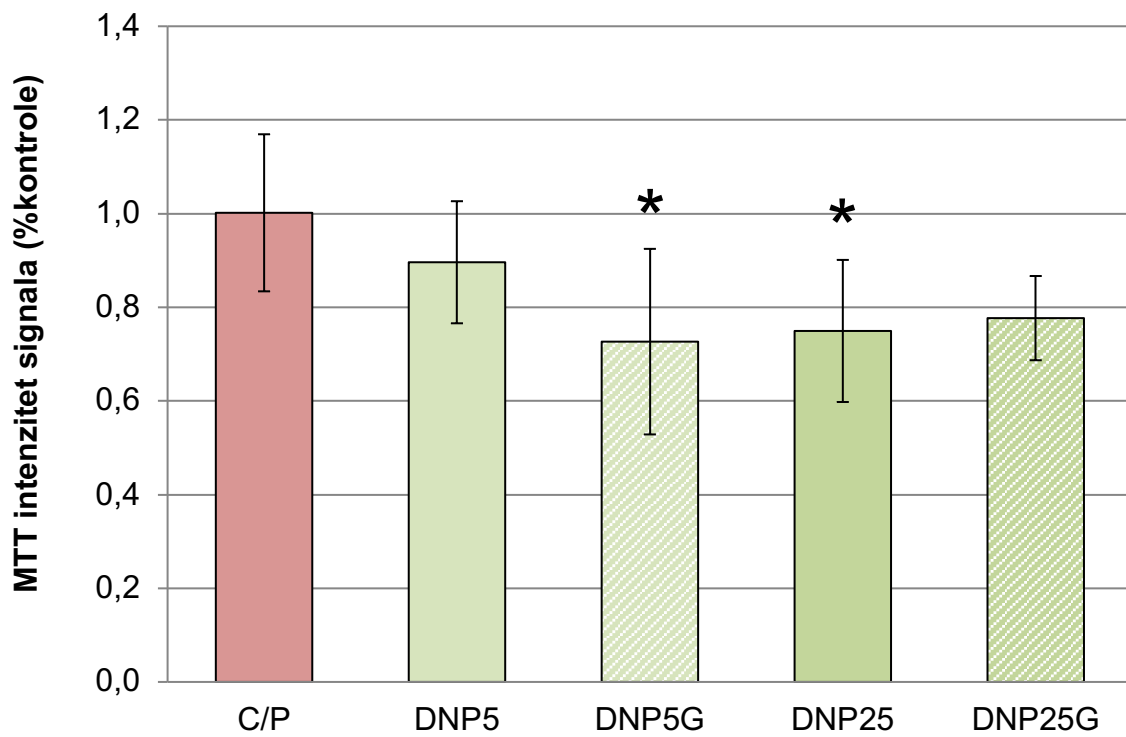
Za razliku od tih rezultata, pri višim koncentracijama, UK 5099, DNP i DCA su potencirali citotoksičnost citostatika C/P, što ukazuje na sinergistički učinak citostatika i modifikatora mitohondrijskog metabolizma na smanjenje proliferacije stanica mezotelioma. Iako je visoka koncentracija glukoze potencirala citotoksični učinak kombinacije C/P i nižih koncentracija DNP-a i DCA-a, pri višim koncentracijama modifikatora energijskog metabolizma mitohondrija, visoka koncentracija glukoze je poništila supresijski učinak C/P-a na stanice.

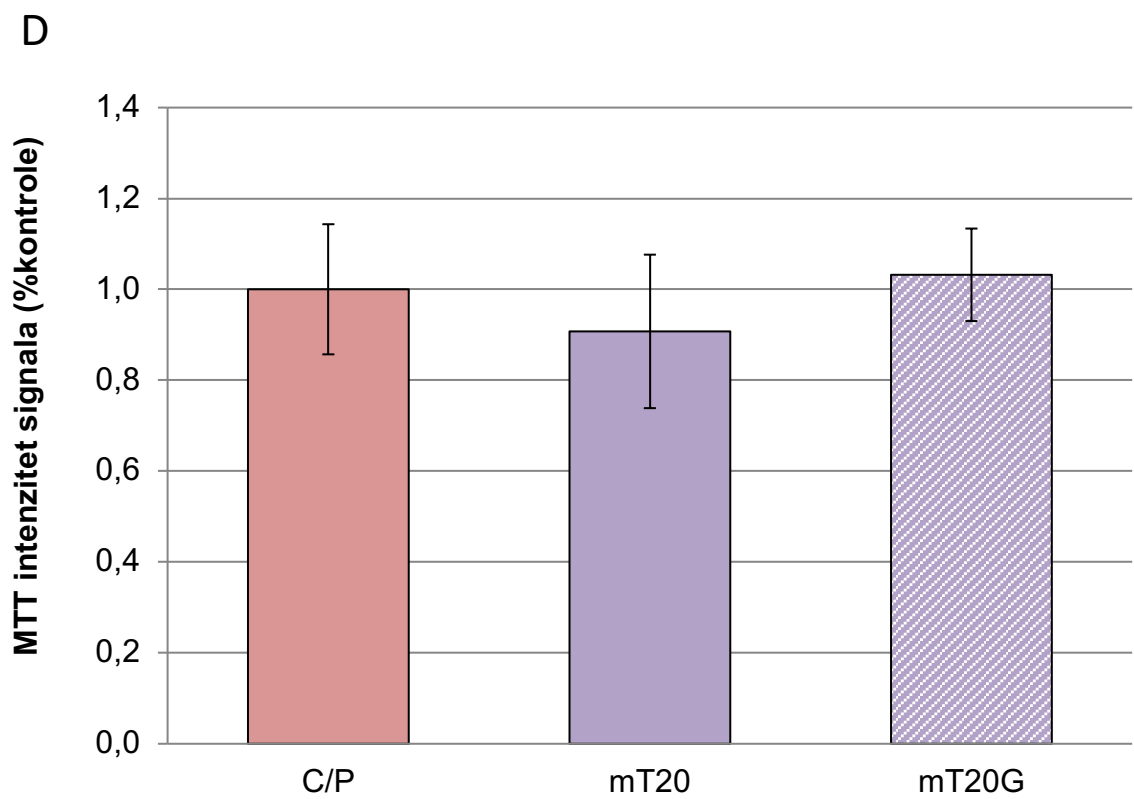
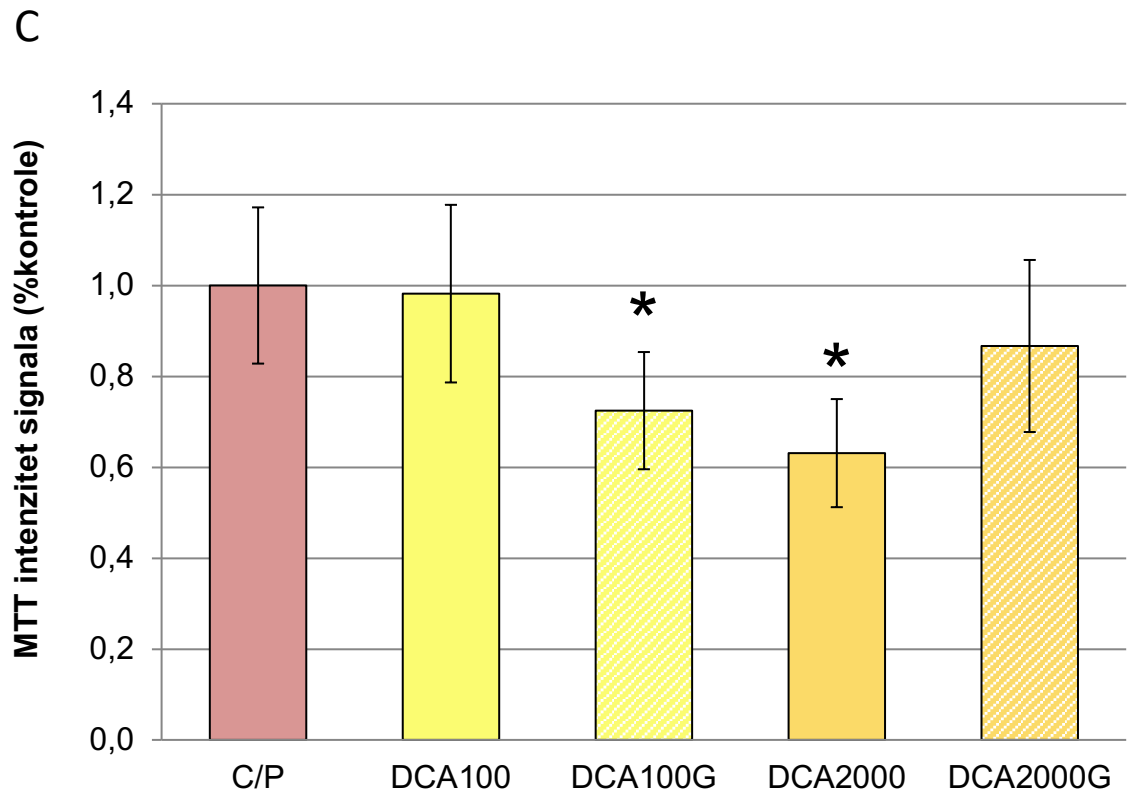
Mitohondrijski antioksidans mitoTEMPO nije potaknuo statistički značajne razlike u proliferaciji stanica.

A



B





Slika 13. Usporedba proliferacije Mero-14 stanica tretiranih kombinacijom cisplatinine i

pemetrekseda i modifikatorima mitohondrijskog energijskog metabolizma te mitohondrijskim antioksidansom: A. UK 5099, B. DNP, C. DCA, D. mitoTEMPO. U svim grafovima, brojka dodana kratici označava koncentraciju tretmana u μM , a slovo „G“ označava dodatak 20 mM glukoze. Na primjer, DCA100G označava tretman s 100 μM DCA i 20 mM glukozom. C/P označava tretman kombinacijom cisplatine i pemetrekseda. Prikazane su srednje vrijednosti svih podataka u pojedinoj pokusnoj skupini \pm SD (n=8). Oznake statističke značajnosti: * $P < 0.05$ prema Ctrl.

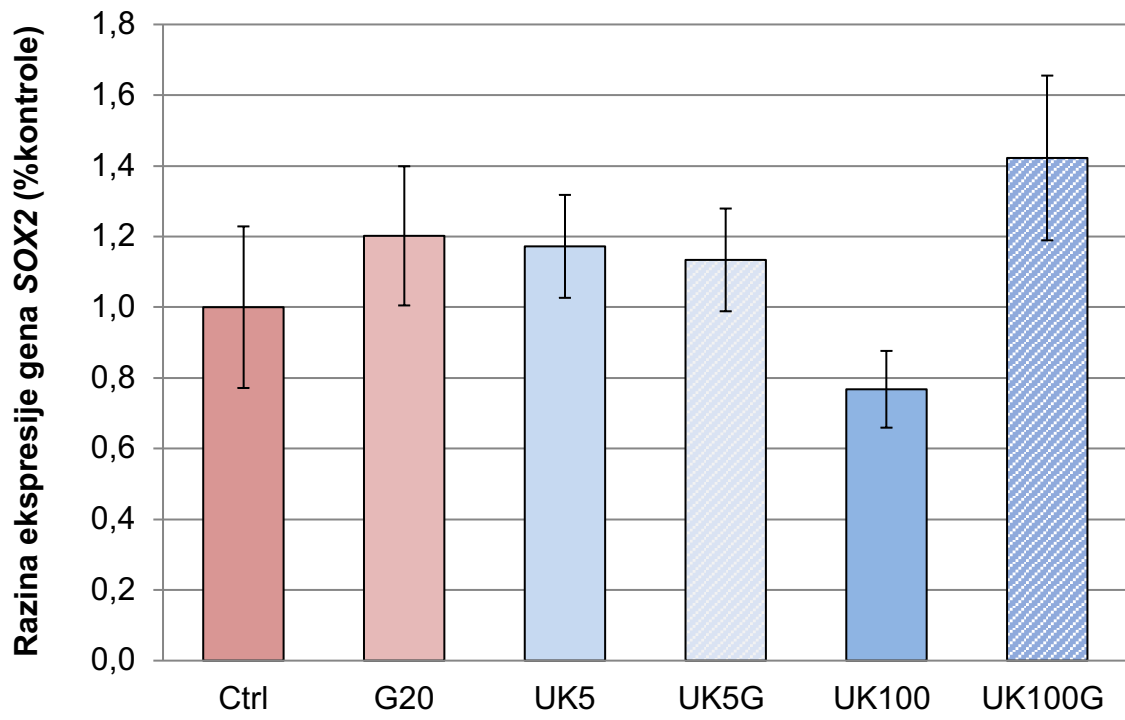
5.5. Učinak modifikatora mitohondrijskog energijskog metabolizma na izražaj SOX2 i NANOG gena

Ispitali smo kakve promjene mogu uzrokovati modifikacije mitohondrijskog energijskog metabolizma na izražaj gena *SOX2* i *NANOG* u stanicama mezotelioma (Slika 14 i 15).

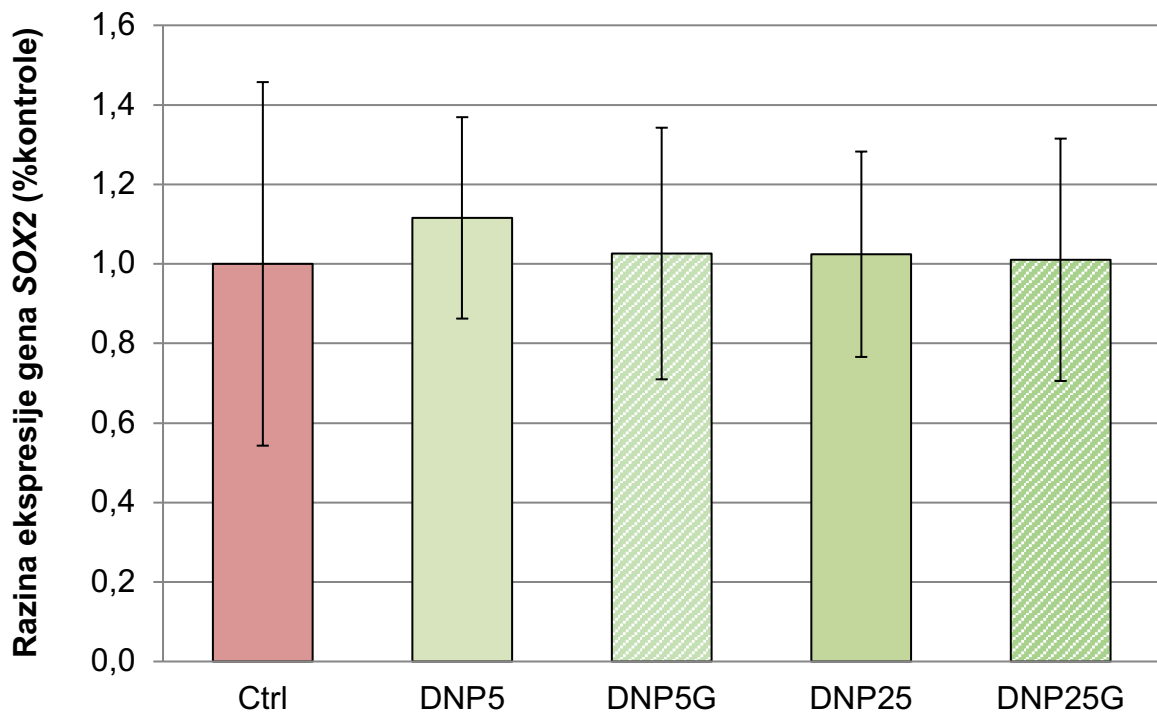
Modifikatori mitohondrijskog energijskog metabolizma UK 5099, DNP i DCA nisu uzrokovali značajne promjene u izražaju gena *SOX2* u višoj ili nižoj koncentraciji niti u kombinaciji s visokom koncentracijom glukoze u donosu na kontrolu.

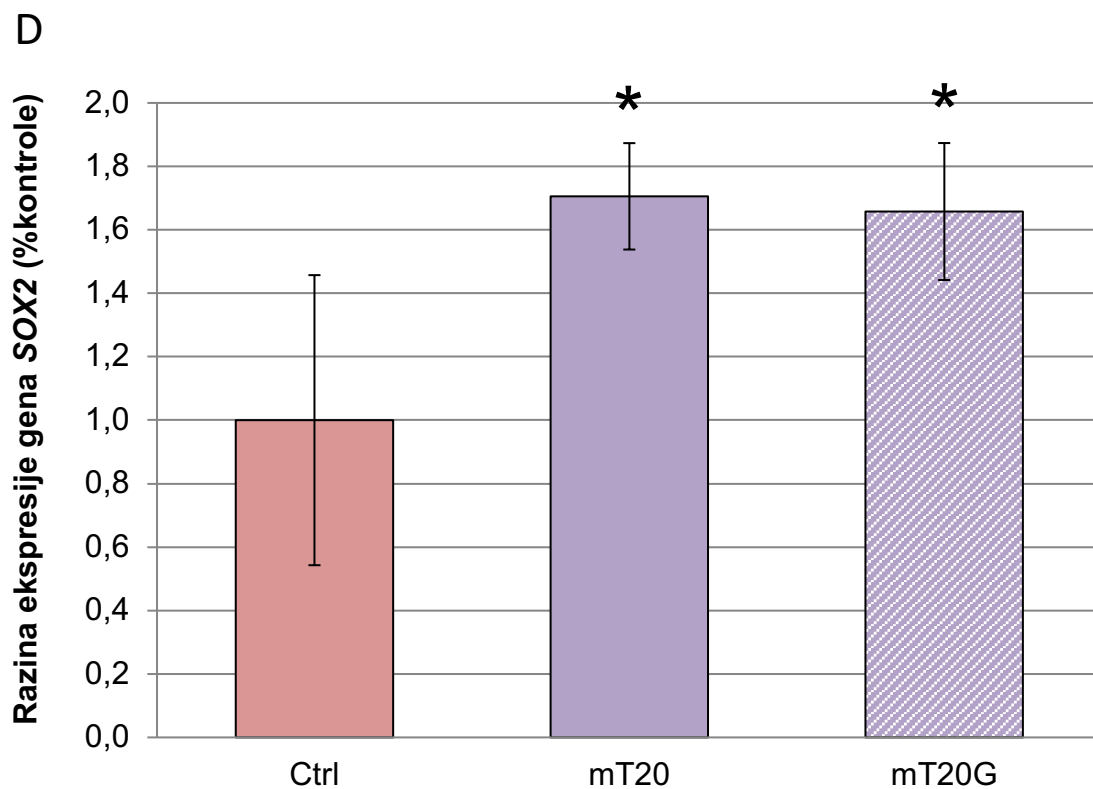
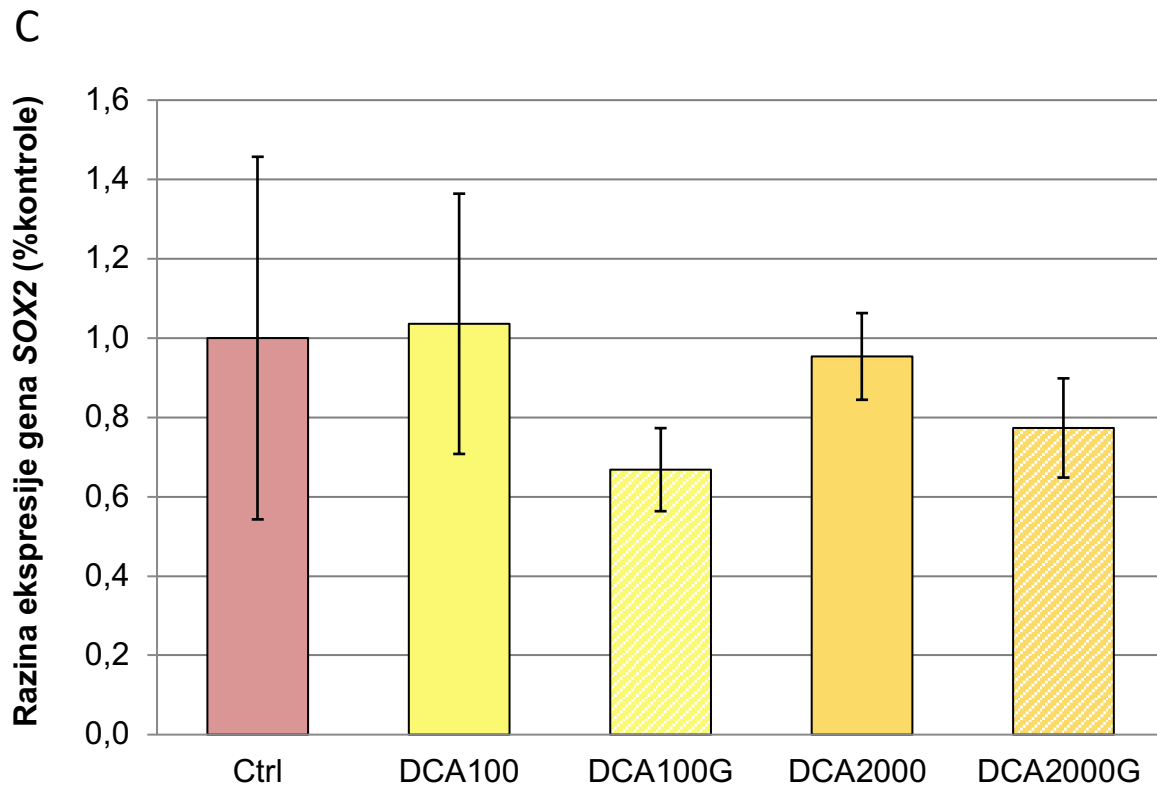
Tretman mitoTEMPO-m u odnosu na kontrolu značajno je povećao razinu ekspresije gena *SOX2* sam i u kombinaciji s visokom koncentracijom glukoze, dok se sami tretmani međusobno nisu značajno razlikovali u razini ekspresije.

A



B



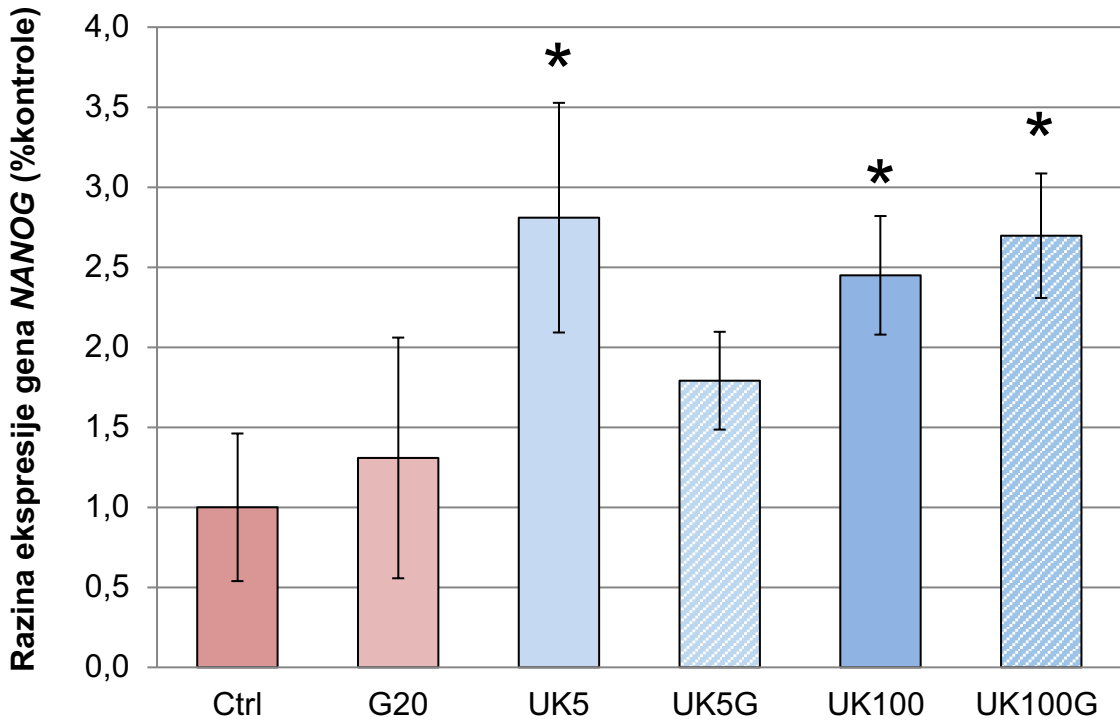


Slika 14. Usporedba razine ekspresije gena SOX2 u Mero-14 stanicama tretiranim molekulama: A. UK 5099, B. DNP, C. DCA, D. mitoTEMPO. U svim grafovima, brojka

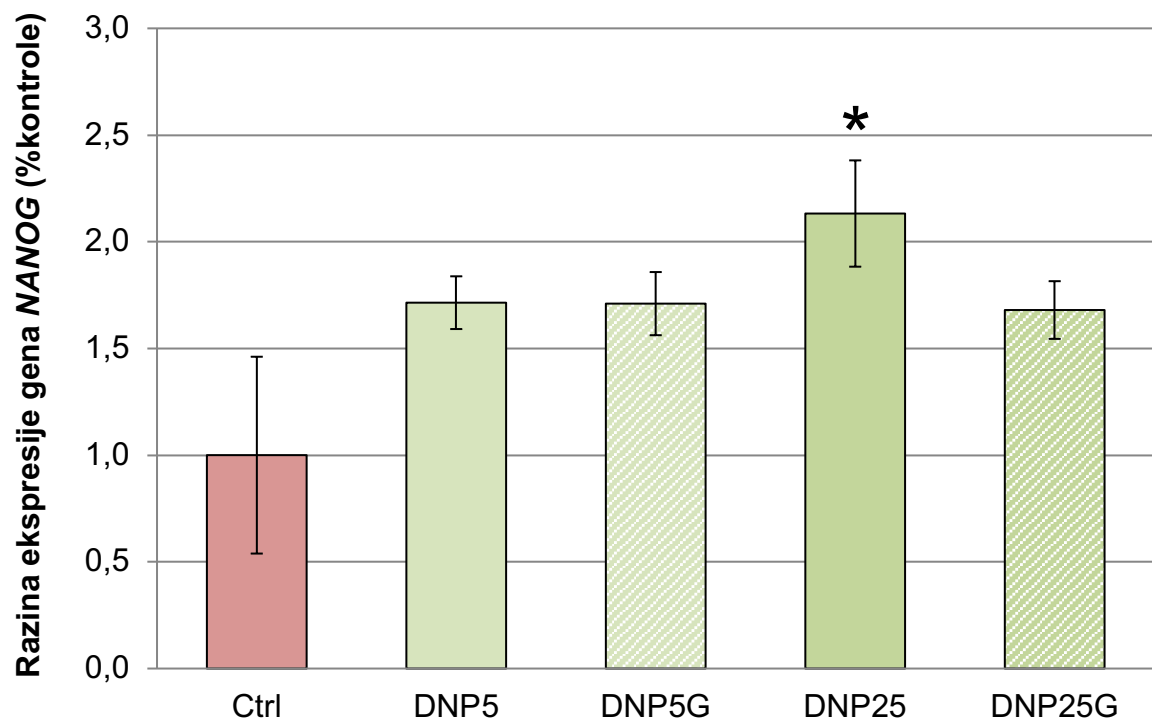
dodana kratici označava koncentraciju tretmana u μM , a slovo „G“ označava dodatak 20 mM glukoze. Na primjer, DCA100G označava tretman s 100 μM DCA i 20 mM glukozom. C/P označava tretman kombinacijom cisplatine i pemetrekseda. Prikazane su srednje vrijednosti svih podataka u pojedinoj pokusnoj skupini \pm SD (n=4). Oznake statističke značajnosti: * $P < 0.05$ prema Ctrl.

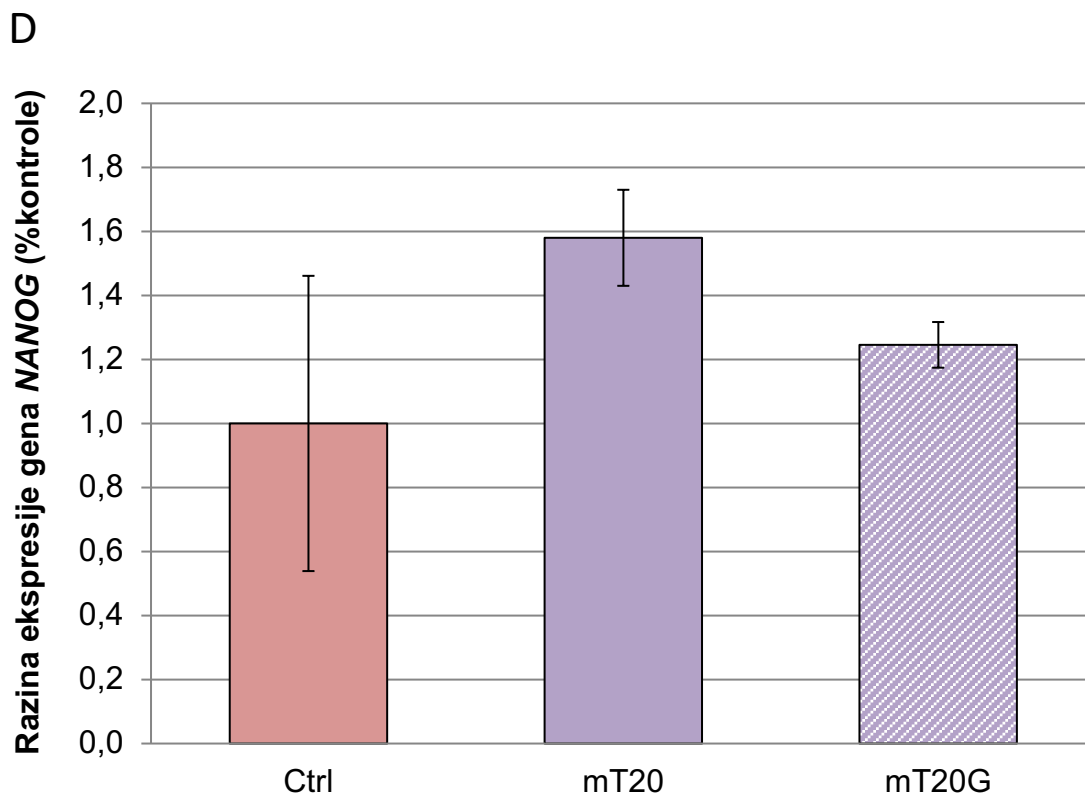
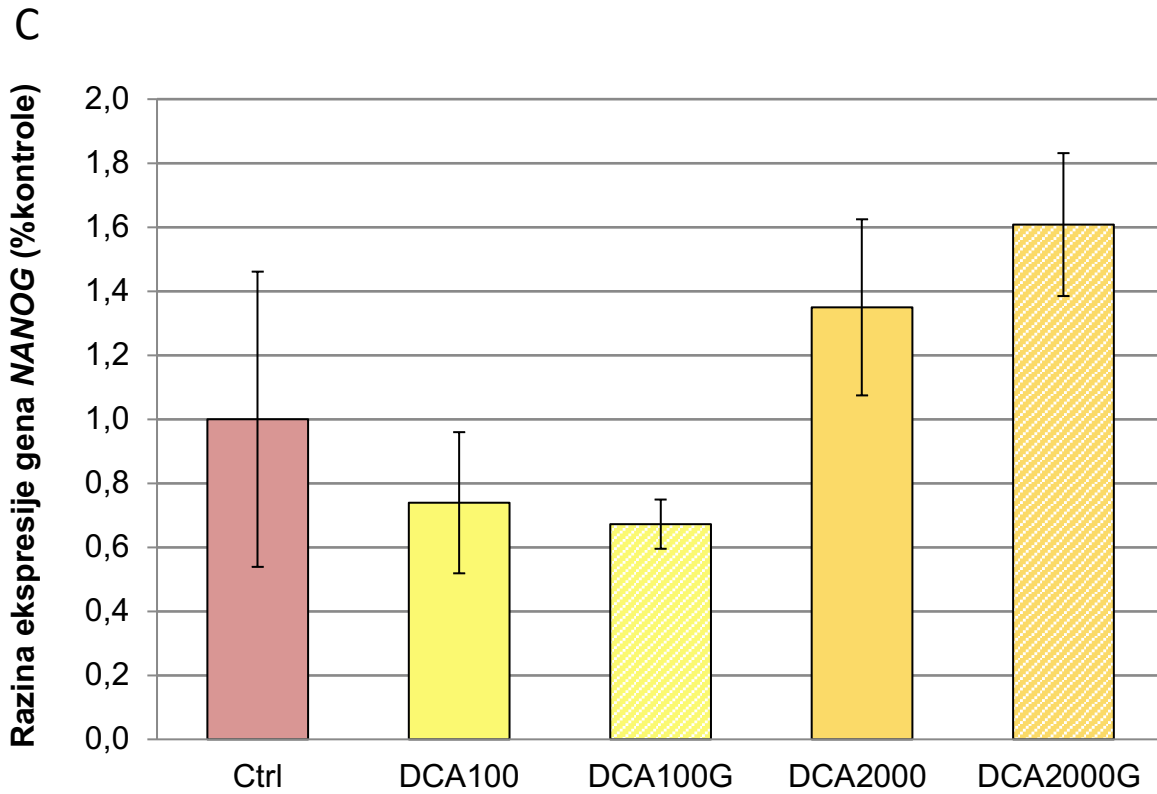
Iako *SOX2* gen nije bio značajno promijenjen, nakon tretmana nižom i višom koncentracijom UK 5099 razina ekspresije gena *NANOG* bila je značajno promijenjena. Kao i kod tretmana višom koncentracijom UK 5099 u kombinaciji s visokom koncentracijom glukoze, razina ekspresije značajno se povisila u odnosu na kontrolu. U odnosu na kontrolu samo je tretman višom koncentracijom DNP-a značajno povisio razinu ekspresije gena *NANOG*. Tretmani DCA-om i mitoTEMPO-om nisu uzrokovali značajne promijene u razini ekspresije gena *NANOG* niti u jednom od tretmana.

A



B





Slika 15. Usporedba razine ekspresije gena *NANOG* u Mero-14 stanicama tretiranim

molekulama: A. UK 5099, B. DNP, C. DCA, D. mitoTEMPO. U svim grafovima, brojka dodana kratici označava koncentraciju tretmana u μM , a slovo „G“ označava dodatak 20 mM glukoze. Na primjer, DCA100G označava tretman s 100 μM DCA i 20 mM glukozom. C/P označava tretman kombinacijom cisplatine i pemetrekseda. Prikazane su srednje vrijednosti svih podataka u pojedinoj pokusnoj skupini \pm SD (n=4). Oznake statističke značajnosti: * $P < 0.05$ prema Ctrl.

6. Rasprava

Ova je studija pokazala da, mjereno MTT esejom, tretman visokom koncentracijom glukoze povećava proliferaciju mezoteliomske stanične linije Mero-14. Modifikacija mitohondrijskog metabolizma različitim pristupima uzrokuje bifazičnu promjenu proliferacije mezoteliomskih stanica, ovisno o koncentraciji farmakološkog agensa koji je primijenjen. DCA, UK 5099 i DNP povećali su proliferaciju mezoteliomskih stanica u nižim koncentracijama, dok su je inhibirali u višim koncentracijama. Iako je sama glukoza u visokoj koncentraciji povećala proliferaciju mezoteliomskih stanica, kombinacija visoke koncentracije glukoze i DCA-a (u 1000 μ M koncentraciji) značajno je smanjila proliferaciju mezoteliomskih stanica u usporedbi s tretmanom samim DCA-om u istoj koncentraciji.

Kombinacija visoke koncentracije glukoze i drugih modifikatora mitohondrijskog energijskog metabolizma nije značajno utjecala na proliferaciju stanica u usporedbi s tretmanom samim modifikatorom. Proliferaciju mezoteliomskih stanica mitoTEMPO je značajno povećao sam i u kombinaciji s visokom koncentracijom glukoze.

Slično utjecaju modifikatora mitohondrijskog metabolizma na proliferaciju stanica, njihov utjecaj na izražaj NANOG proteina je imao bifazičan obrazac. U nižim koncentracijama, UK 5099, DNP i DCA su pojačali izražaj NANOG proteina, dok su u višim koncentracijama inhibirali njegovu ekspresiju. Tretman samom glukozom u visokoj koncentraciji je također povećao izražaj NANOG proteina, ali kombinacija visoke koncentracije glukoze i modifikatora mitohondrijskog metabolizma nije mijenjala izražaj NANOG proteina u usporedbi s tretmanom samim modifikatorom. Promjene izražaja NANOG proteina i proliferacija Mero-14 stanica su pokazali visoki stupanj korelacije u odnosu na različite koncentracije modifikatora mitohondrijskog metabolizma. Ovo uključuje povećanje izražaja NANOG proteina ili proliferacije u

nižim koncentracijama i sniženje izražaja NANOG proteina ili proliferacije u višim koncentracijama.

Ipak, izražaj gena *NANOG* nije pratio iste obrasce kao izražaj proteina. Dok je kod tretmana UK 5099 u nižoj koncentraciji bez prisutstva visoke koncentracije glukoze razina ekspresije značajno povišena (kao i kod proteina) isti je učinak zabilježio i tretman visokom koncentracijom UK 5099 sam i u kombinaciji s visokom koncentracijom glukoze što nije slučaj kod proteina. Ostali tretmani ne podudaraju se u razini promjene ekspresije gena i proteina. Kod gena *SOX2* također nismo primijetili podudarnosti u ekspresijama gena i proteina. Uočene razlike mogu biti posljedica postranskripcijskih regulacijskih mehanizama. Ipak, iako raznolikost zabilježenih rezultata nije bila očekivana, oni potencijalno otvaraju još jedno područje u kojem je moguće nastaviti istraživanje i moguće je da se u ovim diskrepancijama nalazi dodatno objašnjenje načina citoprotektivnog reprogramiranja u tumorskim stanicama. Važno je naglasiti da je izražaj proteina, a ne gena taj koji određuje fenotip stanice i stoga je važniji rezultat promjene izražaja *NANOG* i *SOX2* proteina kao odgovor na modifikaciju mitohondrijskog energijskog metabolizma.

Izražaj *SOX2* proteina nije slijedio obrazac izražaja proteina *NANOG* prilikom modifikacije mitohondrijskog metabolizma. Niti jedan tretman nije povećao izražaj *SOX2* proteina. UK 5099 i visoka koncentracija glukoze nisu mijenjali njegov izražaj. Ekspresija *SOX2* proteina je bila snižena prilikom tretmana visokom koncentracijom DNP-a te niskom i visokom koncentracijom DCA-a. Simultano izlaganje Mero-14 stanica visokoj koncentraciji glukoze i DNP-u ili DCA-u nije značajno mijenjalo izražaj *SOX2* proteina u usporedbi s tretmanom isključivo DNP-om ili DCA-om.

Primjena visoke koncentracije glukoze i standardne kombinacije citostatika cisplatine i pemetrekseda (C/P) nije pokazala značajne učinke na proliferaciju Mero-

14 stanica u usporedbi sa samim tretmanom C/P-om. Dodavanje nižih koncentracija modifikatora mitohondrijskog energijskog metabolizma, UK 5099, DNP-a i DCA-a C/P-u, nije značajno promijenilo proliferaciju mezotelijskih stanica u usporedbi s tretmanom samim citostaticima. S druge strane, dodavanje kombinacije visoke koncentracije glukoze i niže koncentracije DNP-a i DCA-a, ali ne i UK 5099, citostaticima je potenciralo citotoksičnost C/P-a. Spoj mitoTEMPO, sam i u kombinaciji s visokom koncentracijom glukoze, nije utjecao na citotoksičnost C/P-a. Suprotno tome, u višim koncentracijama, svi modifikatori mitohondrijskog metabolizma, UK 5099, DNP i DCA su pojačavali toksični učinak C/P-a na mezotelijske stanice. Zanimljivo, dodavanje visoke koncentracije glukoze ovoj kombinaciji je potpuno poništilo dodatni citotoksični učinak UK 5099, DNP-a i DCA-a.

Ova disertacija je osmišljena s ciljem istraživanja kako modifikacije mitohondrijskog energijskog metabolizma utječu na proliferaciju mezotelijskih stanica kao i na njihovo reprogramiranje putem utjecaja na izražaj gena pluripotencije, *NANOG*-a i *SOX2*. Za modifikaciju mitohondrijskog energijskog metabolizma korištena je visoka koncentracija glukoze, UK 5099 kao inhibitor mitohondrijskog prijenosnika piruvata, DNP kao mitohondrijski rasprežući čimbenik koji ih depolarizira i DCA koji inhibicijom piruvat dehidrogenaza kinaze pojačava ulazak piruvata u mitohondrije zbog disinhibicije piruvat dehidrogenaze. Visoka koncentracija glukoze posredno pojačava mitohondrijski energijski metabolizam jer preko glikolize potiče stvaranje piruvata što dovodi do hiperpolarizacije mitohondrija (99).

Glikoliza je proces koji se odvija u citosolu stanice te se u njemu glukoza dijeli na 2 molekule piruvata (100). Glikoliza se javlja u aerobnim i u anaerobnim uvjetima. U aerobnim uvjetima, piruvat dobiven iz glukoze ulazi u mitohondrije i kasnije sudjeluje u ciklusu limunske kiseline i u oksidativnoj fosforilaciji. Anaerobni uvjeti rezultiraju

zadržavanjem piruvata u citoplazmi i on se tamo pretvara u laktat pomoću enzima laktat dehidrogenaze (101). Prije ulaska u Krebsov ciklus (poznat još i kao ciklus limunske kiseline), piruvat se spaja s koenzimom A i stvara acetil-CoA uz pomoć kompleksa PDH. Krebsov ciklus zatvoreni je slijed reakcija u kojem, između ostalog, nastaju NADH i FADH₂ (reducirani oblici NAD⁺ i FAD⁺) koji dalje sudjeluju u oksidativnoj fosforilaciji (102).

Elektronski transportni lanac niz je kemijskih reakcija u kojima se elektroni brzo prenose do krajnje točke gdje je kisik konačni akceptor elektrona te nastaje voda. Elektroni iz NADH-a i FADH₂ prenose se na proteinske komplekse I, III i IV, koji čine transportni lanac. Preko kompleksa II elektrone mogu prenijeti spojevi koji imaju pozitivniji redoks potencijal, poput sukcinata. Tijekom prolaska preko proteinskih kompleksa, elektroni oslobađaju energiju koja se koristi za pumpanje vodikovih iona iz matriksa mitohondrija u međumembranski prostor, stvarajući pritom elektrokemijski gradijent koji se koristi za stvaranje ATP-a (103). Nusprodukti reakcija u elektronskom transportnom lancu uključuju i nastajanje superoksidnog aniona, jedne od ROS molekula. ROS uključuje nekoliko različitih molekula koje imaju višestruke uloge u organizmu, neke korisne, ali neke i štetne. Da bi se istražilo uključuju li navedene modifikacije mitohondrijskog metabolizma i promjene u mitohondrijskoj proizvodnji ROS-a, korišten je antioksidans mitoTEMPO koji se nakuplja u samim mitohondrijima, ciljano uklanjajući mitohondrijske ROS molekule.

Mi smo po prvi put pokazali da visoka koncentracija glukoze može poticati proliferaciju mezotelijskih stanica. Druge studije su demonstrirale da visoka koncentracija glukoze može poticati proliferaciju različitih tumorskih i netumorskih stanica. Ovo uključuje proliferaciju stanica raka dojke (stanična linija MDAMB231), stanica raka gušterače (stanične linije BxPC-3 i Panc-1), stanice raka endometrija

(ECC-1 i Ishikawa stanične linije), stanica adenokarcinoma pluća (A549 stanična linija) i stanica karcinoma mokraćnog mjehura (T24 stanična linija), kao i netumorskih stanica, poput endotelnih stanica aorte štakora (RAOEC stanična linija) i epitelnih stanica kanala gušterače (PDE-6 stanična linija) (104–110).

Dodavanje visoke koncentracije glukoze 1000 μ M DCA-u je značajno smanjilo proliferaciju mezoteliomskih stanica u usporedbi sa samim DCA-om. Ovo svojstvo visoke koncentracije glukoze bi se moglo iskoristiti za poništavanje negativnih učinaka DCA, a to je poticanje proliferacije stanica mezotelima pri nižim koncentracijama DCA koji bi se potencijalno mogle pojaviti u dijelovima tumora sa slabijom prokrvljenosti. Visoka koncentracija glukoze i DCA mogu pokazivati aditivni učinak na mezoteliomske stanice zbog komplementarnog mehanizma djelovanja. Naime, DCA omogućava veći utok piruvata u ciklus limunske kiseline disinhbijacijom PDH-a. S druge strane, visoka koncentracija glukoze uzrokuje povećano stvaranje piruvata, koji sada pojačano ulazi u ciklus limunske kiseline. Osim toga, visoka koncentracija glukoze je poništila indukciju NANOG proteina potaknutu niskim koncentracijama UK 5099 i DNP-a. Visoka koncentracija glukoze je potencirala citotoksični učinak kombinacije C/P i svakog testiranog modifikatora mitohondrijskog metabolizma u nižim koncentracijama, UK 5099, DNP-a i DCA-a. Ovo ponovno sugerira da visoka koncentracija glukoze može imati aditivni učinak na citotoksično djelovanje modifikatora mitohondrijskog metabolizma. Ipak, visoka koncentracija glukoze je poništila citotoksični učinak viših koncentracija modifikatora mitohondrijskog energijskog metabolizma, UK 5099, DNP-a i DCA-a. Ovaj naizgled proturiječni odgovor sugerira da kombinacija klasičnih citostatika, modifikatora mitohondrijskog metabolizma i visoke koncentracije glukoze ima kompleksan učinak na mezoteliomske stanice. Sama visoka koncentracija glukoze je poticala proliferaciju Mero-14 stanica i izražaj NANOG proteina, što bi bili

nepovoljni učinci za pacijente. S druge strane, dodatak visoke koncentracije glukoze modifikatorima energijskog metabolizma, s ili bez citostatika, većinom je smanjivao proliferaciju mezoteliomskih stanica i izražaj NANOG-a. Dakle, ukupno gledajući dodatak visoke koncentracije glukoze ovim testiranim anti-tumorskim lijekovima većinom bi mogao djelovati povoljno na liječenje, ali su potrebna daljnja istraživanja o mehanizmima njihovog međudjelovanja, prije nego se ova kombinacija eventualno uvede u kliničku praksu. Zanimljivo je da onkološki pacijenti, uključujući one oboljele od mezotelioma, nerijetko imaju hiperglikemiju. Naša saznanja su stoga jako važna prilikom razmatranja učinka hiperglikemije na samo liječenje navedenim citostaticima, a potencijalno i modifikatorima mitohondrijskog energijskog metabolizma.

Naši rezultati su po prvi put pokazali bifazičan učinak UK 5099 na proliferaciju i izražaj NANOG proteina u mezoteliomskim stanicama. Pri nižoj koncentraciji UK 5099 je povećao proliferaciju i izražaj NANOG proteina, dok je suprotni učinak postigla njegova viša koncentracija, inhibicija proliferacije i smanjeni izražaj NANOG proteina. UK 5099 djeluje tako da inhibira mitohondrijski kotransport piruvata i vodika, što dovodi do smanjenog ulaska piruvata u mitohondrije.

Primjena UK 5099 na staničnoj liniji raka prostate (LnCap) rezultirala je smanjenjem stope potrošnje kisika i proizvodnje ATP-a, smanjenjem potencijala na mitohondrijskoj membrani te povećanom proizvodnjom ROS-a. Poremećeni unos piruvata putem blokiranja MPC-a od strane UK 5099 rezultirao je disfunkcijom oksidativne fosforilacije u mitohondriju i pojačanom aerobnom glikolizom te povišenim razinama markera matičnih stanica i visokom otpornošću na kemoterapijski reagens cisplatin. S druge strane, Corbet i sur. ustvrdili su da je, kod stanica koje imaju eksprimiran MPC-1, UK 5099 doveo do značajno smanjene sposobnosti formiranja tumorskih sfera (64). Čini se da je razina ekspresije MPC-a na mitohondriju bitan faktor

koji određuje krajnji učinak UK 5099 na tumorsku stanicu. Pa iako je poznato da su razine ekspresije MPC-a u nekim karcinomima smanjene, čini se da je prilagodba stanice na inaktivaciju nosača na mitohondriju različita među staničnim linijama te ovisi i o eksperimentalnom protokolu (64,111).

U višoj, ali ne i u nižoj koncentraciji, UK 5099 je pojačao toksični učinak C/P citostatika na mezoteliomske stanice u našoj studiji. Ovo sugerira da UK 5099 s jedne strane i C/P s druge imaju sinergističke učinke. Sve zajedno, UK 5099 bi mogao, samostalno ili u kombinaciji s cisplatinom i pemetreksedom, povoljno djelovati na pacijente s mezoteliomom. Daljnje studije su potrebne da bi se potvrdili naši rezultati. Pri tome treba imati na umu da u nižim koncentracijama samostalna primjena UK 5099, ali ne i u kombinaciji s C/P, može imati nepovoljan učinak i poticati proliferaciju mezoteliomskih stanica.

U ovoj je disertaciji pokazano da DNP bifazično mijenja proliferaciju mezoteliomskih stanica i izražaj NANOG proteina. Djelovanje DNP je karakterizirano rasprezanjem oksidativne fosforilacije zbog prebacivanja protona u mitohondrijski matriks, čime se zaobilazi ATP sintaza. Kao rezultat, DNP smanjuje proizvodnju ATP-a i mitohondrijski membranski potencijal. Prethodna studija je pokazala da niska koncentracija DNP-a može smanjivati proizvodnju ROS-a u mitohondrijima i tako štititi stanice od oštećenja potaknutog oksidativnim stresom (112). Citoprotektivno i organoprotektivno djelovanje DNP i sličnih rasprežućih molekula je dobro potkrijepljeno brojnim studijama (113,114).

Nekoliko studija je pokazalo da DNP može djelovati anti-tumorski tako da, ovisno o dozi i duljini tretmana, u stanicama pojačava apoptotičke signalne puteve (73–76). Slično učinku UK 5099, DNP je pri višoj koncentraciji pojačao citotoksični učinak C/P-a, sugerirajući da značajnija depolarizacija mitohondrija odnosno

smanjenje proizvodnje ATP-a u mitohondrijima djeluje sinergistički sa citostaticima. Nadalje, i ovaj pokus potvrđuje da su mitohondriji izuzetno važni za regulaciju diferencijacije i vijabilnost mezoteliomskih stanica.

Naši rezultati upućuju da DCA, kao i UK 5099 i DNP, također bifazično utječe na proliferaciju i izražaj NANOG proteina u mezoteliomskim stanicama. DCA potiče oksidaciju piruvata u ciklusu limunske kiseline. Naime, DCA inhibira PDK koja inhibira PDH. Tretman s DCA molekulom može dovesti do hiperpolarizacije mitohondrija u tumorskim stanicama (115). Više je studija pokazalo da DCA može djelovati anti-tumorski (58,79–81). Istraživanja ukazuju da je glavni mehanizam djelovanja DCA na stanice raka njegov učinak na ravnotežu PDH i PDK. Kao posljedica toga dolazi do dvije temeljne promjene u metabolizmu koje su antagonizirale rast tumora, metastaziranje i podržavale preživljavanje. Prva je preusmjeravanje metabolizma glukoze s anaerobne glikolize na oksidaciju, a druga velika promjena u metabolizmu tumora je smanjenje koncentracije laktata i vodikovih iona u mikrookolišu stanice (58).

Naši podatci sugeriraju da bi DCA mogao djelovati povoljno, bilo sam, bilo u kombinaciji s C/P antineoplastičnim agensima u liječenju mezotelioma, ali je potrebno provesti još studija za definitivnu potvrdu ovih rezultata.

Tretman niskim koncentracijama modifikatora mitohondrijskog metabolizma uglavnom je poticao proliferaciju Mero-14 stanica i izražaj NANOG proteina. Suprotno tome, tretman njihovim visokima koncentracijama je suprimirao proliferaciju i smanjivao izražaj NANOG proteina. Ovako dobra korelacija između promjene proliferacije stanica i izražaja NANOG proteina u odgovoru na različite koncentracije pojedinih testiranih modifikatora mitohondrijskog metabolizma sugerira da NANOG potiče proliferaciju mezoteliomskih stanica. Ovo zapažanje je u suglasju s već objavljenim podacima za druge vrste zdravih i tumorskih stanica, gdje se NANOG

povezuje s poticanjem proliferacije, ali i invazivnosti, metastaziranja i kemorezistencije (116). Tako, na primjer, NANOG potiče proliferaciju pločastih stanica karcinoma jednjaka (117). S druge strane, utišavanje NANOG-a suprimira proliferaciju matičnih stanica masnog tkiva (118). Za razliku od NANOG proteina, promjene izražaja SOX2 proteina u odgovoru na modifikatore mitohondrijskog metabolizma nisu korelirale s promjenama proliferacije stanica u našoj studiji. Ukupno gledajući, modifikatori mitohondrijskog metabolizma imali su slabiji učinak na izražaj SOX2 proteina nego NANOG proteina. Visoka koncentracija glukoze i UK 5099 nisu uopće mijenjali izražaj SOX2 proteina. Tek su DCA u obje koncentracije i DNP u višoj koncentraciji umjereno snizili izražaj SOX2 proteina. Dodatak visoke koncentracije glukoze ovim tretmanima nije polučio dodatni učinak. Izostanak korelacije promjena proliferacije mezotelijskih stanica i izražaja SOX2 proteina sugeriraju da NANOG znatno jače utječe na proliferaciju mezotelijskih stanica od SOX2.

Demonstrirali smo da mitoTEMPO smanjuje proliferaciju mezotelijskih stanica i izražaj NANOG proteina. Spoj mitoTEMPO je antioksidans koji se selektivno nakuplja u mitohondrijima gdje detoksicira ROS molekule nastale u mitohondrijima (119). Nazarewich i suradnici proučavali su *in vivo* učinak i ustanovili da je mitoTEMPO potisnuo rast tumora u mišjem modelu ljudskog melanoma. Pokazali su i da je uklanjanjem mitohondrijskog superoksida inhibiran rast stanica, smanjena njihova vijabilnost te dolazi do indukcije apoptoze u stanicama melanoma, ali da pritom mitoTEMPO nije utjecao na nemaligne fibroblaste kože. Smanjeni mitohondrijski superoksid inhibirao je redoks-ovisan AKT, obnovljenu aktivnost mitohondrijske PDH i smanjio ekspresiju HIF1- α i laktat dehidrogenaze u stanicama raka (89). Porporato i suradnicu su pak utvrdili da mitoTEMPO sprječava spontane metastaze ljudskih

stanica raka dojke prirodno sklonih metastaziranju (MDA-MB-231 stanična linija) implantiranih ortotopski u miša (120).

Cisplatin djeluje tako što pojačava stvaranje ROS-a i oksidativni stres. Stoga, mitoTEMPO bi mogao poništiti antitumorske-činke ovog citostatika. Unatoč tome, naši rezultati pokazuju da mitoTEMPO nije imao učinka na citotoksičnost C/P-a, unatoč relativno visokoj koncentraciji mitoTEMPO-a. Naši rezultati su u skladu s nedavnom studijom koja pokazuje da mitoTEMPO nije utjecao na progresiju melanoma i raka pluća u mišjem modelu (87). Suprotno ovim rezultatima, mitoTEMPO je blokirao migraciju stanica i metastaziranje pločastih stanica raka grlića maternice (90). Ovakvi suprotni rezultati mogu biti posljedica razlika među samim tumorima, odnosno različitog utjecaja mitohondrijskih ROS molekula na homeostazu tumorskih stanica, ovisno o kojem tipu raka se radi. U ovom je radu pokazano da modifikatori mitohondrijskog metabolizma u višim koncentracijama pojačavaju toksične učinke standardnih anti-mezotelijskih citostatika cisplatine i pemetrekseda.

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazuju analogne promjene proliferacije stanica i izražaja NANOG proteina, jednog od čimbenika pluripotencije stanica. Pri čemu niže koncentracije mitohondrijskih modifikatora stimuliraju izražaj NANOG proteina i paralelno potiču proliferaciju, a više koncentracije snižavaju izražaj NANOG proteina i potiskuju proliferaciju stanica. U prethodnom je radu pokazano da ljudski mezoteliomi i mezotelijske stanice u kulturi izražavaju NANOG i SOX2 proteine i gene u većoj mjeri nego normalni mezotel, pri čemu je izražaj NANOG, ali ne i SOX2 proteina jače izražen u slabije diferenciranim tumorima. Dakle, izražaj NANOG proteina i čimbenika pluripotencije je indikator slabije diferencijacije tumora i njegovo poticanje sugerira reprogramiranje tumorskih stanica i dediferencijaciju koja se povezuje s bržom progresijom bolesti i agresivnijim ponašanjem tumora (121–124).

Brojne studije su pokazale da povećan izražaj gena pluripotencije odražava niži stupanj diferencijacije tumora (125,126). Stoga, indukcija NANOG proteina koju smo zamijetili pri tretmanu nižim koncentracijama modifikatora mitohondrijskog metabolizma vjerojatno reflektira poticanje njihove dediferencijacije koja ubrzava proliferaciju stanica. Sukladno tome bi i inhibicija izražaja NANOG proteina pri tretmanu višim koncentracijama modifikatora mitohondrijskog metabolizma, odražavala reprogramiranje mezoteliomskih stanica, odnosno poticanje diferencijacije uz usporavanje stanične proliferacije.

7. Zaključak

Prikazani rezultati po prvi su put pokazali da sva tri testirana modifikatora mitohondrijskog energijskog metabolizma, UK 5099, DNP i DCA imaju sličan obrazac djelovanja u smislu stimulacije proliferacije mezoteliomskih stanica pri nižim koncentracijama, inhibicije proliferacije pri višim koncentracijama, te pojačavanja citotoksičnog učinka kombinacije citostatika cisplatina i pemetrekseda pri višim koncentracijama.

Visoka koncentracija glukoze može poticati proliferaciju stanica. Dodavanje visoke koncentracije glukoze modifikatorima mitohondrijskog metabolizma, s ili bez citostatika, može potencirati citotoksičnost, ali i poništavati je.

Uklanjanje mitohondrijskih reaktivnih spojeva kisika mitoTEMPO-om stimulira proliferaciju mezoteliomskih stanica, sugerirajući da ROS suprimiraju rast mezoteliomskih stanica.

Sličan obrazac djelovanja modifikatora mitohondrijskog metabolizma na mezoteliomske stanice i bifazični odgovori, sugeriraju da su mitohondriji važni za proliferaciju stanica mezotelioma te da mitohondriji na kompleksan način sudjeluju u regulaciji homeostaze ovih tumorskih stanica.

Slabije perturbacije mitohondrijskog energijskog metabolizma, potaknute nižim koncentracijama modifikatora, UK 5099, DNP-a i DCA-a, daju poticaj na diobu stanica mezotelioma i izražaj NANOG čimbenika pluripotencije. Suprotno tome, više koncentracije ovih modifikatora izravno suprimiraju proliferaciju mezoteliomskih stanica i izražaj NANOG-a te potenciraju učinak citostatika, što ukazuje da značajnije promjene mitohondrijske funkcije suprimiraju mezoteliomske stanice.

Dakle, u ovom je istraživanju hipoteza djelomično opovrgnuta, a djelomično potvrđena. Visoka koncentracija glukoze nije potaknula ekspresiju gena *SOX2* i *NANOG* u staničnoj liniji Mero-14, ali je povećala vijabilnost stanica.

Inhibitori mitohondrijskog energijskog metabolizma u višim koncentracijama su snižavali proliferaciju stanica, dok mitohondrijski antioksidans mitoTEMPO to nije uspio ostvariti.

Naši rezultati bi trebali biti poticaj na daljnje studije u kojima bi se dodatno rasvijetlili mehanizmi djelovanja UK 5099, DNP-a i DCA-a i njihov potencijal za liječenje mezotelioma.

8. Kratki sadržaj na hrvatskom jeziku

U ovom je istraživanju, na staničnoj liniji Mero-14, ispitano kako visoka koncentracija glukoze i modifikatori mitohondrijskog energijskog metabolizma utječu na ekspresiju čimbenika pluripotentnosti SOX2 i NANOG te mijenjaju li takvi tretmani otpornost stanica na antineoplastične agense.

Stanice su tretirane modifikatorima mitohondrijskog energijskog metabolizma pojedinačno ili zajedno s visokom koncentracijom glukoze. Proliferacija je procijenjena spektrofotometrijski, imunocitokemijskim bojenjem kvantificirana je ekspresija proteina SOX2 i NANOG, a za analizu relativne ekspresije gena SOX2 i NANOG, korišten je kvantitativni PCR. Kako bi se ispitala otpornost mezoteliomskih stanica na antineoplastične agense, pratila se vijabilnost stanica kao odgovor na različite koncentracije antineoplastičnih agensa.

Dobiveni rezultati pokazali su da sva tri testirana modifikatora mitohondrijskog energijskog metabolizma, UK 5099, DNP i DCA, imaju sličan obrazac djelovanja; stimulacija proliferacije mezoteliomskih stanica pri nižim koncentracijama, inhibicija proliferacije pri višim koncentracijama te pojačavanje citotoksičnog učinka kombinacije citostatika cisplatina i pemetrekseda pri višim koncentracijama.

Promjena izražaja NANOG proteina uglavnom je slijedila promjenu proliferacije stanica u navedenim pokusnim skupinama. Suprotno tome, izražaj NANOG gena te SOX2 gena i proteina nije pratio ovaj obrazac. Sama visoka koncentracija glukoze je poticala proliferaciju, ali u kombinaciji s modifikatorima mitohondrijskog metabolizma je uglavnom poništavala proliferacijski učinak modifikatora primijenjenih u nižim koncentracijama.

9. Kratki sadržaj na engleskom jeziku

The influence of mitochondrial energy metabolism and high glucose concentration on expression of pluripotency genes *SOX2* and *NANOG* and the viability of mesothelioma cells *in vivo*

Sunčana Sikirić, 2023

This study examined how high glucose concentrations and modulators of mitochondrial energy metabolism affect the expression of pluripotency factors *SOX2* and *NANOG* in the Mero-14 cell line and whether such treatments alter cell resistance to antineoplastic agents.

Cells were treated with modulators of mitochondrial energy metabolism individually or together with high concentrations of glucose. To examine the resistance of mesothelioma cells to antineoplastic agents, cell viability was monitored in response to different concentrations of antineoplastic agents.

The results showed that all three tested modifiers of mitochondrial energy metabolism, UK 5099, DNP and DCA, have a similar pattern of action: stimulation of mesothelioma cell proliferation at lower concentrations, inhibition of proliferation at higher concentrations, and potentiation of the cytotoxic effect of the combination of the cytostatics cisplatin and pemetrexed at higher concentrations.

The change in *NANOG* protein expression mostly followed the change in cell proliferation. In contrast, the expression of the *NANOG* gene and the *SOX2* gene and protein did not follow this pattern. High glucose alone stimulated proliferation, but in combination with modulators of mitochondrial metabolism it largely reversed the proliferative effect of modulators administered at lower concentrations.

10. Literatura

1. Brown LB, Corl F, Blackmon SH. Surgical staging and resection of malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Dis.* 2020 Dec 1;12(12):7467–80. doi: 10.21037/jtd-19-2267
2. Røe OD, Stella GM. Malignant pleural mesothelioma: History, controversy and future of a manmade epidemic. *Eur Respir Rev.* 2015;24(135):115–31.
3. Tward JD, Wendland MMM, Shrieve DC, Szabo A, Gaffney DK. The risk of secondary malignancies over 30 years after the treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer.* 2006;107(1):108–15.
4. Belicza M. Kirurška patologija. Zagreb: Školska knjiga; 2010.
5. Damjanov I, Seiwert S, Jukić S, Nola M. Patologija, peto, prerađeno i dopunjeno izdanje. 5 izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2015.
6. Jean D, Daubriac J, Le Pimpec-Barthes F, Galateau-Salle F, Jaurand MC. Molecular changes in mesothelioma with an impact on prognosis and treatment. *Arch Pathol Lab Med.* 2012;136:277–93.
7. Jaurand MC, Fleury-Feith J. Pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. *Respirology.* 2005 Jan;10(1):2-8. doi: 10.1111/j.1440-1843.2005.00694.x
8. Barrett JC, Lamb PW, Wiseman RW. Multiple mechanisms for the carcinogenic effects of asbestos and other mineral fibers. *Environ Health Perspect.* 1989;81:81-9. doi: 10.1289/ehp.898181
9. Murthy SS, Testa JR. Asbestos, chromosomal deletions, and tumor suppressor gene alterations in human malignant mesothelioma. *J Cell Physiol.* 1999;180:150–7.

10. Bueno R, Stawiski EW, Goldstein LD, Durinck S, De Rienzo A, Modrusan Z i sur. Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat Genet.* 2016;48(4):407–16.
11. Carbone M, Yang H, Pass HI, Krausz T, Testa JR, Gaudino G. BAP1 and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13:153–9.
12. Hassan R, Morrow B, Thomas A, Walsh T, Lee MK, Gulsuner S i sur. Inherited predisposition to malignant mesothelioma and overall survival following platinum chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116(18):9008–13.
13. Liu D. Handbook of Tumor Syndromes: BAP1 Tumor Predisposition Syndrome [internet]. Boca Raton: CRC Press; 2020 [pristupljeno 28.8.2020.]. Dostupno na: <https://www.routledgehandbooks.com/doi/10.1201/9781351187435-3>
14. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man: Some Inorganic and Organometallic Compounds. Lyon: IARC;1973.
15. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Asbestos. *Tox Profiles.* 2002.
16. Dilek Y, Newcomb S. Ophiolite Concept and the Evolution of Geological Thought. Boulder: The Geological Society of America; 2003.
17. Rapp G. *Archaeomineralogy.* Berlin: Springer; 2009.
18. Ribak J, Lilis R, Suzuki Y, Penner L, Selikoff IJ. Malignant mesothelioma in a cohort of asbestos insulation workers: Clinical presentation, diagnosis, and causes of death. *Br J Ind Med.* 1988;45(3):182–7.

19. Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med.* 1960;17(4):260-71. doi: 10.1136/oem.17.4.260
20. Stayner LT, Danhovic DA, Lemen RA. Occupational exposure to chrysotile asbestos and cancer risk: a review of the amphibole hypothesis. *Am J Public Health.* 1996;86(2):179–86. doi: 10.2105/AJPH.86.2.179
21. Nicholson WJ. The carcinogenicity of chrysotile asbestos-a review. *Ind Health.* 2001;39(2):57–64. doi: 10.2486/INDHEALTH.39.57
22. Lemen RA. Chrysotile asbestos as a cause of mesothelioma: application of the Hill causation model. *Int J Occup Environ Health.* 2004;10(2):233–9. doi: 10.1179/OEH.2004.10.2.233
23. Concha-Barrientos M, Nelson DI, Driscoll T, Steenland NK, Punnett L, Fingerhut MA i sur. Selected occupational risk factors. U: Murray C, Ezzati M, Lopez A, Rodgers A, Vander Hoorn S, ur. *Comparative quantification of health risks: Global and Regional Burden of Diseases Attributable to Selected Major Risk Factors.* Ženeva: World Health Organization; 2004. Str. 1651–801.
24. United States Department of Health and Human Services. Report on Carcinogens. 14. izd. Research Triangle Park: National Toxicology Program; 2016.
25. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts. Lyon: IARC; 2012.
26. You L, Guo X, Huang Y. Correlation of cancer stem-cell markers OCT4, SOX2, and NANOG with clinicopathological features and prognosis in operative patients with rectal cancer. *Yonsei Med J.* 2018;59(1):35–42.

27. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL i sur. Cancer stem cells - Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 2006;66(19):9339–44.
28. Liu A, Yu X, Liu S. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: Small genes make a big difference. *Chin J Cancer.* 2013;32(9):483–7. doi: 10.5732/cjc.012.10282
29. Wang X, Dai J. Concise review: Isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. *Stem Cells.* 2010;28(5):885–93.
30. Zhang J, Wang X, Li M, Han J, Chen B, Wang B i sur. NANOGP8 is a retrogene expressed in cancers. *FEBS J.* 2006;273:1723–30.
31. Li X, Wang J, Xu Z, Ahmad A, Li E, Wang Y i sur. Expression of Sox2 and Oct4 and their clinical significance in human non-small-cell lung cancer. *Int J Mol Sci.* 2012;13:7663–75.
32. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: Meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:441–64. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237
33. Dashty M. A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clin Biochem.* 2013 Oct 1;46(15):1339–52.
34. Chalmers S, Nicholls DG. The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *J Biol Chem.* 2003 May 23;278(21):19062–70. doi: 10.1074/JBC.M212661200
35. Geisler JG. Targeting energy expenditure via fuel switching and beyond. *Diabetologia.* 2011 Feb 1;54(2):237–44. doi: 10.1007/s00125-010-1932-4
36. Geisler J. 2,4 Dinitrophenol as Medicine. *Cells.* 2019 Mar 23;8(3):280. doi: 10.3390/CELLS8030280

37. Milne GL, Dai Q, Roberts LJ. The isoprostanes—25 years later. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Apr 1;1851(4):433–45.
38. Cox MM, Nelson DL. *Lehninger principles of biochemistry*. 5. izd. New York: W. H. Freeman; 2008.
39. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309–14.
40. Cori CF, Cori GT. The carbohydrate metabolism of tumors: II. Changes in the sugar, lactic acid, and CO- combining power of blood passing through a tumor. *J Biol Chem*. 1925;65(2):397–405.
41. Xu XD, Shao SX, Jiang HP, Cao YW, Wang YH, Yang XC i sur. Warburg effect or reverse Warburg effect? A review of cancer metabolism. *Oncol Res Treat*. 2015;38(3):117–22. doi: 10.1159/000375435. Epub 2015 Feb.
42. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(10):685–98.
43. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*. 2016 Jan 12;23(1):27–47.
44. Sullivan LB, Gui DY, Van Der Heiden MG. Altered metabolite levels in cancer: Implications for tumour biology and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016 Oct 24;16(11):680–93.
45. Morais R, Zinkewich-Péotti K, Parent M, Wang H, Zollinger M, Babai F. Tumor-forming Ability in Athymic Nude Mice of Human Cell Lines Devoid of Mitochondrial DNA. *Cancer Res*. 1994;54:3889–96.
46. Chen X, Qian Y, Wu S. The Warburg effect: Evolving interpretations of an established concept. *Free Radic Biol Med*. 2015;79:253–63.
47. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*. 2007;274(6):1393–418.

48. Kalyanaraman B. Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. *Redox Biol.* 2017 Aug 1;12:833–42.
49. Li H, Li X, Ge X, Jia L, Zhang Z, Fang R i sur. MiR-34b-3 and miR-449a inhibit malignant progression of nasopharyngeal carcinoma by targeting lactate dehydrogenase A. *Oncotarget.* 2016;7(34):54838–51.
50. Hay N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: Can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer.* 2016 Sep 23;16(10):635–49. doi: 10.1038/nrc.2016.77
51. Samudio I, Fiegl M, Andreeff M. Mitochondrial uncoupling and the warburg effect: Molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Res.* 2009 Mar 15;69(6):2163–6.
52. Stern R, Shuster S, Neudecker BA, Formby B. Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: The Warburg effect revisited. *Exp Cell Res.* 2002 May 15;276(1):24–31.
53. Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Front Cell Dev Biol.* 2017 Mar 23;5:18.
54. Pfeiffer T, Schuster S, Bonhoeffer S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science.* 2001 Apr 20;292(5516):504–7.
55. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: A recipe for cancer growth. *Genes Dev.* 2009;23(5):537–48.
56. Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci.* 2010;35(8):427–33.

57. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011 Feb;11(2):85–95. doi: 10.1038/NRC2981
58. Kankotia S, Stacpoole PW. Dichloroacetate and cancer: new home for an orphan drug? *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug 23;1846(2):617–29. doi: 10.1016/J.BBCAN.2014.08.005
59. Herzig S, Raemy E, Montessuit S, Veuthey JL, Zamboni N, Westermann B i sur. Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science*. 2012 Jul 6;337(6090):93–6. doi: 10.1126/SCIENCE.1218530
60. Buchanan JL, Taylor EB. Mitochondrial Pyruvate Carrier Function in Health and Disease across the Lifespan. *Biomolecules*. 2020 Aug 8;10(8):1162. doi: 10.3390/BIOM10081162
61. Hildyard JCW, Ämmälä C, Dukes ID, Thomson SA, Halestrap AP. Identification and characterisation of a new class of highly specific and potent inhibitors of the mitochondrial pyruvate carrier. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1707(2–3):221–30. doi: 10.1016/j.bbabbio.2004.12.005.
62. Zhong Y, Li X, Yu D, Li X, Li Y, Long Y i sur. Application of mitochondrial pyruvate carrier blocker UK5099 creates metabolic reprogram and greater stem-like properties in LnCap prostate cancer cells in vitro. *Oncotarget*. 2015;6(35):37758–69. doi: 10.18632/ONCOTARGET.5386
63. Buyse C, Joudiou N, Corbet C, Feron O, Mignion L, Flament J i sur. Impact of Inhibition of the Mitochondrial Pyruvate Carrier on the Tumor Extracellular pH as Measured by CEST-MRI. *Cancers (Basel)*. 2021 Sep 1;13(17):4278. doi: 10.3390/CANCERS13174278
64. Corbet C, Bastien E, Draoui N, Doix B, Mignion L, Jordan BF i sur. Interruption of lactate uptake by inhibiting mitochondrial pyruvate transport unravels direct

- antitumor and radiosensitizing effects. *Nat Commun.* 2018 Dec 1;9(1):1208.
doi: 10.1038/S41467-018-03525-0
65. Douette P, Sluse FE. Mitochondrial uncoupling proteins: new insights from functional and proteomic studies. *Free Radic Biol Med.* 2006 Apr 1;40(7):1097–107. doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2005.12.010
 66. Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta.* 2018 Sep 1;1859(9):940–50.
 67. Weinbach EC, Garbus J. Mechanism of Action of Reagents that uncouple Oxidative Phosphorylation. *Nature.* 1969;221(5185):1016–8. doi: 10.1038/2211016a0
 68. Loomis WF, Lipmann F. Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation. *J Biol Chem.* 1948 Apr 1;173(2):807–8.
 69. Demine S, Renard P, Arnould T. Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases. *Cells.* 2019 Jul 30;8(8):795. doi: 10.3390/CELLS8080795
 70. Shrestha R, Johnson E, Byrne FL. Exploring the therapeutic potential of mitochondrial uncouplers in cancer. *Mol Metab.* 2021 Sep 1;51:101222. doi: 10.1016/J.MOLMET.2021.101222
 71. Harper JA, Dickinson K, Brand MD. Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. *Obes Rev.* 2001;2(4):255–65. doi: 10.1046/J.1467-789X.2001.00043.X
 72. Jiang H, Jin J, Duan Y, Xie Z, Li Y, Gao A i sur. Mitochondrial Uncoupling Coordinated With PDH Activation Safely Ameliorates Hyperglycemia via Promoting Glucose Oxidation. *Diabetes.* 2019 Dec 1;68(12):2197–209. doi: 10.2337/DB19-0589

73. Linsinger G, Wilhelm S, Wagner H, Häcker G. Uncouplers of Oxidative Phosphorylation Can Enhance a Fas Death Signal. *Mol Cell Biol*. 1999 May;19(5):3299–311.
74. Vier J, Gerhard M, Wagner H, Häcker G. Enhancement of death-receptor induced caspase-8-activation in the death-inducing signalling complex by uncoupling of oxidative phosphorylation. *Mol Immunol*. 2004 Jan 1;40(10):661–70.
75. Han YH, Kim SW, Kim SH, Kim SZ, Park WH. 2,4-Dinitrophenol induces G1 phase arrest and apoptosis in human pulmonary adenocarcinoma Calu-6 cells. *Toxicol Vitr*. 2008 Apr 1;22(3):659–70.
76. Han YH, Kim SZ, Kim SH, Park WH. 2,4-Dinitrophenol induces apoptosis in As4.1 juxtaglomerular cells through rapid depletion of GSH. *Cell Biol Int*. 2008 Dec 1;32(12):1536–45.
77. James MO, Jahn SC, Zhong G, Smeltz MG, Hu Z, Stacpoole PW. Therapeutic applications of dichloroacetate and the role of glutathione transferase zeta-1. *Pharmacol Ther*. 2017 Feb 1;170:166–80. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.10.018.
78. Michelakis ED, Webster L, Mackey JR. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer*. 2008 Oct 7;99(7):989–94. doi: 10.1038/SJ.BJC.6604554
79. Stacpoole PW, Nagaraja N v, Hutson AD. Efficacy of dichloroacetate as a lactate-lowering drug. *J Clin Pharmacol*. 2003 Jul;43(7):683–91.
80. Ruggieri V, Agriesti F, Scrima R, Laurenzana I, Perrone D, Tataranni T i sur. Dichloroacetate, a selective mitochondria-targeting drug for oral squamous cell

- carcinoma: a metabolic perspective of treatment. *Oncotarget*. 2015 Jan 20;6(2):1217–30. doi: 10.18632/ONCOTARGET.2721
81. Tataranni T, Agriesti F, Pacelli C, Ruggieri V, Laurenzana I, Mazzoccoli C i sur. Dichloroacetate Affects Mitochondrial Function and Stemness-Associated Properties in Pancreatic Cancer Cell Lines. *Cells*. 2019 May 18;8(5):478. doi: 10.3390/CELLS8050478
 82. Birch-Machin MA, Turnbull DM. Assaying mitochondrial respiratory complex activity in mitochondria isolated from human cells and tissues. *Methods Cell Biol*. 2001;65:97–117. doi: 10.1016/S0091-679X(01)65006-4
 83. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):19. doi: 10.1097/WOX.0B013E3182439613
 84. Oyewole AO, Birch-Machin MA. Mitochondria-targeted antioxidants. *FASEB J*. 2015 Dec 1;29(12):4766–71. doi: 10.1096/FJ.15-275404
 85. Chen L, Hu JY, Wang SQ. The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. *J Am Acad Dermatol*. 2012;67(5):1013–24. doi: 10.1016/J.JAAD.2012.02.009
 86. Ni R, Cao T, Xiong S, Ma J, Fan GC, Lacefield JC i sur. Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med*. 2016 Jan 1;90:12–23.
 87. le Gal K, Wiel C, Ibrahim MX, Henricsson M, Sayin VI, Bergo MO. Mitochondria-Targeted Antioxidants MitoQ and MitoTEMPO Do Not Influence BRAF-Driven Malignant Melanoma and KRAS-Driven Lung Cancer Progression in Mice. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Feb 1;10(2):163. doi: 10.3390/ANTIOX10020163

88. Shetty S, Kumar R, Bharati S. Mito-TEMPO, a mitochondria-targeted antioxidant, prevents N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Free Radic Biol Med*. 2019 May 20;136:76–86.
89. Nazarewicz RR, Dikalova A, Bikineyeva A, Ivanov S, Kirilyuk IA, Grigor'Ev IA i sur. Does scavenging of mitochondrial superoxide attenuate cancer prosurvival signaling pathways? *Antioxid Redox Signal*. 2013 Aug 1;19(4):344–9. doi: 10.1089/ARS.2013.5185
90. Porporato PE, Payen VL, Pérez-Escuredo J, de Saedeleer CJ, Danhier P, Copetti T i sur. A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis. *Cell Rep*. 2014 Aug 7;8(3):754–66. doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.043.
91. Francetić I, Makar-Aušperger K, Reiner Ž, ur. *Farmakoterapijski priručnik*. 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada.
92. Adjei AA. Pharmacology and mechanism of action of pemetrexed. *Clin Lung Cancer*. 2004 Apr;5 Suppl 2:S51-5. doi: 10.3816/CLC.2004.S.003
93. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014 Oct 5;740:364-78. doi: 10.1016/J.EJPHAR.2014.07.025
94. Philippeos C, Hughes RD, Dhawan A, Mitry RR. Introduction to Cell Culture. *Methods Mol Biol*. 2012;806:1–13. doi: 10.1007/978-1-61779-367-7_1
95. Baust JM, Buehring GC, Campbell L, Elmore E, Harbell JW, Nims RW i sur. Best practices in cell culture: an overview. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2017 Sep 1;53(8):669–72. doi: 10.1007/S11626-017-0177-7
96. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8. doi: 10.1006/METH.2001.1262

97. Takeda K, Mizushima T, Yokoyama Y, Hirose H, Wu X, Qian Y i sur. Sox2 is associated with cancer stem-like properties in colorectal cancer. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1):17639. doi: 10.1038/S41598-018-36251-0
98. Sedlic F, Seiwerth F, Sepac A, Sikiric S, Cindric M, Milavic M i sur. Mitochondrial ROS Induce Partial Dedifferentiation of Human Mesothelioma via Upregulation of NANOG. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Jul 1;9(7):606. doi: 10.3390/ANTIOX9070606
99. Sedlic F, Muravyeva MY, Sepac A, Sedlic M, Williams AM, Yang M i sur. Targeted Modification of Mitochondrial ROS Production Converts High Glucose-Induced Cytotoxicity to Cytoprotection: Effects on Anesthetic Preconditioning. *J Cell Physiol*. 2017 Jan 1;232(1):216–24. doi: 10.1002/JCP.25413
100. Akram M. Mini-review on glycolysis and cancer. *J Cancer Educ*. 2013 Sep 1;28(3):454–7. doi: 10.1007/s13187-013-0486-9
101. Granchi C, Bertini S, Macchia M, Minutolo F. Inhibitors of lactate dehydrogenase isoforms and their therapeutic potentials. *Curr Med Chem*. 2010 Jan 18;17(7):672–97. doi: 10.2174/092986710790416263
102. Kumari A. Citric Acid Cycle. U: Kumari A, ur. *Sweet Biochemistry*. Cambridge: Academic Press; 2018. Str.7–11.
103. Kumari A. Electron Transport Chain. U: Kumari A, ur. *Sweet Biochemistry*. Cambridge; Academic Press; 2018. Str.13–6.
104. Hou Y, Zhou M, Xie J, Chao P, Feng Q, Wu J. High glucose levels promote the proliferation of breast cancer cells through GTPases. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2017 Jun 13;9:429–36. doi: 10.2147/BCTT.S135665

105. Han L, Ma Q, Li J, Liu H, Li W, Ma G i sur. High glucose promotes pancreatic cancer cell proliferation via the induction of EGF expression and transactivation of EGFR. *PLoS One*. 2011 Nov 8;6(11):e27074. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0027074
106. Han J, Zhang L, Guo H, Wysham WZ, Roque DR, Willson AK i sur. Glucose promotes cell proliferation, glucose uptake and invasion in endometrial cancer cells via AMPK/mTOR/S6 and MAPK signaling. *Gynecol Oncol*. 2015 Sep 1;138(3):668–75. doi: 10.1016/J.YGYNO.2015.06.036
107. Liao YF, Yin S, Chen ZQ, Li F, Zhao B. High glucose promotes tumor cell proliferation and migration in lung adenocarcinoma via the RAGE-NOXs pathway. *Mol Med Rep*. 2018 Jun 1;17(6):8536–41. doi: 10.3892/MMR.2018.8914
108. Gao L, Xu FM, Shi WJ, Zhang S, Lu YL, Zhao DK i sur. High-glucose promotes proliferation of human bladder cancer T24 cells by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(23):8151–60. doi: 10.26355/EURREV_201812_16507
109. Li XX, Liu YM, Li YJ, Xie N, Yan YF, Chi YL i sur. High glucose concentration induces endothelial cell proliferation by regulating cyclin-D2-related miR-98. *J Cell Mol Med*. 2016 Jun 1;20(6):1169. doi: 10.1111/JCMM.12765
110. Ito M, Makino N, Matsuda A, Ikeda Y, Kakizaki Y, Saito Y i sur. High Glucose Accelerates Cell Proliferation and Increases the Secretion and mRNA Expression of Osteopontin in Human Pancreatic Duct Epithelial Cells. *Int J Mol Sci*. 2017 Apr 12;18(4):807. doi: 10.3390/IJMS18040807
111. Schell JC, Olson KA, Jiang L, Hawkins AJ, VanVranken JG, Xie J i sur. A role for the mitochondrial pyruvate carrier as a repressor of the Warburg Effect and

- colon cancer cell growth. *Mol Cell*. 2014;56(3):413. doi:
10.1016/j.molcel.2014.09.026
112. Sedlic F, Sepac A, Pravdic D, Camara AKS, Bienengraeber M, Brzezinska AK
i sur. Mitochondrial depolarization underlies delay in permeability transition by
preconditioning with isoflurane: roles of ROS and Ca²⁺. *Am J Physiol Cell
Physiol*. 2010 Aug;299(2):C506–15. doi: 10.1152/AJPCELL.00006.2010
113. Gao JL, Zhao J, Zhu H bin, Peng X, Zhu JX, Ma MH i sur. Characterizations of
mitochondrial uncoupling induced by chemical mitochondrial uncouplers in
cardiomyocytes. *Free Radic Biol Med*. 2018 Aug 20;124:288–98. doi:
10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.06.020
114. Wu H, Ye M, Liu D, Yang J, Ding J Wang, Zhang J i sur. UCP2 protect the
heart from myocardial ischemia/reperfusion injury via induction of
mitochondrial autophagy. *J Cell Biochem*. 2019 Sep 1;120(9):15455–66. doi:
10.1002/JCB.28812
115. Pathak RK, Marrache S, Harn DA, Dhar S. Mito-DCA: a mitochondria targeted
molecular scaffold for efficacious delivery of metabolic modulator
dichloroacetate. *ACS Chem Biol*. 2014 May 16;9(5):1178–87. doi:
10.1021/CB400944Y
116. Fatma H, Siddique HR, Maurya SK. The multiple faces of NANOG in cancer: a
therapeutic target to chemosensitize therapy-resistant cancers. *Epigenomics*.
2021 Dec 1;13(23):1885–900. doi: 10.2217/EPI-2021-0228
117. Deng L, Zhang X, Xiang X, Xiong R, Xiao D, Chen Z i sur. NANOG Promotes
Cell Proliferation, Invasion, and Stemness via IL-6/STAT3 Signaling in
Esophageal Squamous Carcinoma. *Technol Cancer Res Treat*. 2021 Jan-
Dec;20:15330338211038492. doi: 10.1177/15330338211038492

118. Pitrone M, Pizzolanti G, Coppola A, Tomasello L, Martorana S, Pantuso G i sur. Knockdown of NANOG Reduces Cell Proliferation and Induces G0/G1 Cell Cycle Arrest in Human Adipose Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2019 May 2;20(10):2580. doi: 10.3390/IJMS20102580
119. Liang HL, Sedlic F, Bosnjak Z, Nilakantan V. SOD1 and MitoTEMPO partially prevent mitochondrial permeability transition pore opening, necrosis, and mitochondrial apoptosis after ATP depletion recovery. *Free Radic Biol Med*. 2010 Nov 30;49(10):1550–60. doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2010.08.018
120. Porporato PE, Payen VL, Pérez-Escuredo J, de Saedeleer CJ, Danhier P, Copetti T i sur. A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis. *Cell Rep*. 2014 Aug 7;8(3):754–66. doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.043
121. Watanabe M, Ohnishi Y, Inoue H, Wato M, Tanaka A, Kakudo K i sur. NANOG expression correlates with differentiation, metastasis and resistance to preoperative adjuvant therapy in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2014;7(1):40. doi: 10.3892/OL.2013.1690
122. Gawlik-Rzemieniewska N, Bednarek I. The role of NANOG transcriptional factor in the development of malignant phenotype of cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2016 Jan 2;17(1):10. doi: 10.1080/15384047.2015.1121348
123. Markiewicz A, Nagel A, Szade J, Majewska H, Skokowski J, Seroczynska B i sur. Aggressive Phenotype of Cells Disseminated via Hematogenous and Lymphatic Route in Breast Cancer Patients. *Transl Oncol*. 2018 Jun 1;11(3):722–31. doi: 10.1016/J.TRANON.2018.03.006
124. Rasti A, Mehrazma M, Madjd Z, Abolhasani M, Saeednejad Zanjani L, Asgari M. Co-expression of Cancer Stem Cell Markers OCT4 and NANOG Predicts

Poor Prognosis in Renal Cell Carcinomas. *Sci Rep.* 2018 Dec 1;8(1):11739.

doi: 10.1038/S41598-018-30168-4

125. Müller M, Hermann PC, Liebau S, Weidgang C, Seufferlein T, Kleger A i sur.

The role of pluripotency factors to drive stemness in gastrointestinal cancer.

Stem Cell Res. 2016 Mar 1;16(2):349–57.

126. Friedmann-Morvinski D, Verma IM. Dedifferentiation and reprogramming:

origins of cancer stem cells. *EMBO Rep.* 2014;15(3):253. doi:

10.1002/EMBR.201338254

11. Biografija

Sunčana Sikirić rođena je 1991. godine u Zagrebu, gdje je završila osnovnu i srednju školu te upisala studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Znanstvenu karijeru započinje upisom na doktorski studij Biomedicine i zdravstva na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, kao doktorandica zaposlena na HRZZ projektu. Istraživanje za svoj doktorski rad provodi u sklopu Laboratorija za molekularnu patologiju na Zavodu za patologiju uz vodstvo i pomoć mentora prof. dr. sc. Svena Seiwertha, voditelja HRZZ projekta „Reprogramiranje citoprotektivnih puteva u mezoteliomu“.